THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE PARIS

par

Françoise BASTIDE

pour obtenir le grade de Docteur Es Sciences

Sujet de la Thèse : Mécanisme d action des hormones neurohypophysaires sur le transport actif de sodium à travers la peau de grenouille.

soutenue le 4.5.1970 devant la Commission d Examen

M.M. A . JOST — Président
H . CLAUSER
F . MOREL — Examinateurs

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549218_0018

THESE DE DOCTORAT D'ETAT ES SCIENCES NATURELLES

présentée

A LA FACULTE DES SCIENCES

DE PARIS

PAR

Françoise BASTIDE

pour obtenir

le grade de Docteur Es-Sciences

Sujet de la Thèse : Mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires sur le transport actif de sodium à travers la peau de grenouille.

Soutenue le 4/5/1970 devant la Commission d'Examen.

MM. A. JOST Président

H. CLAUSER
F. MOREL Examinateurs

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION page 1

CHAPITRE I. - SCHEMA FONCTIONNEL DES CELLULES EPITHELIALES DE LA PEAU DE LA GRENOUILLE. METHODE DU COURANT DE COURT-CIRCUIT. 4

Introduction 4

A. Modèle pour le fonctionnement des cellules assurant un transport actif de sodium.

B. Mesure du flux net de sodium par la méthode du courant de court-circuit. 8

CHAPITRE II. RÔLE D'INTERMEDIAIRE DE L'AMP CYCLIQUE DANS L'ACTION DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES . COMPARAISON AVEC L'ACTION DES CATECHOLAMINES 10

Introduction 10

Matériel et Méthodes 12

Résultats 14

A. Comparaison de l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur le courant de court-circuit et les flux de sodium et de chlorure. 14

B. Dissociation des récepteurs à l'ocytocine et à la noradrénaline 18

C. Rôle d'intermédiaire de l'AMPcyclique dans l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline 20

Discussion 22

CHAPITRE III. RECHERCHE D'UNE ACTION HORMONALE SUR LA PERMEABILITE POUR LE SODIUM DE LA FACE MUQUEUSE DES CELLULES EPITHELIALES. 28

Introduction 28

Matériel et Méthodes page 32

Résultats 33

A. Action de l'ocytocine en courant de court-circuit négatif 33

B. Action hormonale en fonction de la concentration du sodium externe 37

Discussion 40

CHAPITRE IV. - ETUDE DE L'ACTIVITE ATPASIQUE Na^+, K^+ - DEPENDANTE DE LA PEAU ET DE LA VESSIE 46

Introduction 46

Matériel et Méthodes 49

Résultats 53

A. Caractéristiques générales de l'activité ATPasique de vessie et de peau 53

B. Activation en fonction de la concentration de sodium 54

C. Comparaison de l'ATPase II de vessie à l'ATPase de cerveau 55

D. Action de l'AMPcyclique sur l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante de la vessie 57

E. Action de l'aldostérone sur l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante de la peau et de la vessie 57

Discussion 58

CONCLUSION GENERALE 64

RESUME 65

BIBLIOGRAPHIE 67

INTRODUCTION

La peau et la vessie des amphibiens, depuis qu'a été découvert leur rôle dans le maintien de l'équilibre hydrominéral de l'animal, ont été utilisées comme modèles pour l'étude de la réaborsoption de l'eau et du sodium par le tube distal du néphron des mammifères. En effet, chez les amphibiens, ces structures sont le siège d'une réabsorption facultative de l'eau et du sodium ; il est donc raisonnable de penser que les études faites sur ces structures permettent une approche des mécanismes correspondants dans le rein. En outre, les régulations hormonales de ces fonctions paraissent analogues. En effet, les hormones neurohypophysaires provoquent chez les amphibiens une perméabilisation osmotique pour l'eau (action hydrosmotique) et une augmentation de la réabsorption active de sodium (effet natrifférique) non seulement dans le tubule rénal (1) mais encore dans la peau (2, 3) et dans la vessie (4, 5, cf. également 6). L'action hydrosmotique de l'hormone antidiurétique sur le tubule distal du rein de mammifère est bien établie (7). Toutefois, l'éventualité d'une action natrifférique de cette hormone sur le nephron de mammifère est encore discutée. MOREL (8) a suggéré qu'elle pourrait stimuler la réabsorption de sodium dans les anses ascendantes de HENLÉ, contribuant ainsi à l'établissement du gradient de pression osmotique dans la médulla. L'aldostérone a une action natrifférique sur la peau et la vessie, analogue à son action dans le néphron, cette action natrifférique n'est pas phasique, contrairement à celle des hormones neurohyophysaires, mais lente et durable. Le traitement des animaux par l'aldostérone provoque un effet natrifférique qui subsiste même après que la peau et la vessie aient été isolées (9, 10). Il a été montré que l'aldostérone produit cet effet en controlant la synthèse de protéine(s) spécifique(s), ce qui explique à la fois le temps de latence et la durée prolongée de son action (11, 12, 13)

Le mécanisme d'action des hormones neurohypophysaires ou de l'aldostérone est étudié beaucoup plus commodément sur la peau et la

vessie que sur le néphron. En effet, ces structures, composées de cellules épithéliales fonctionnellement orientées et supportées par une couche de tissus conjonctif, sont faciles à isoler. De plus, elles peuvent être maintenues en survie dans un milieu salin entièrement artificiel pendant des temps prolongés (24 h). Ces structures se prêtent donc particulièrement bien à une étude in vitro des effets des hormones ou de divers agents pharmacologiques car il est possible de les monter entre deux chambres et d'étudier leurs propriétés de perméabilité à l'aide de molécules marquées ou d'isotopes radioactifs. En outre, USSING et ZERAHN (14) ont mis au point une méthode permettant de mesurer le flux net de sodium, qui ne nécessite pas la mesure simultanée des deux flux unidirectionnels de sodium. Cette méthode, dite du "courant de court-circuit" est plus précise ; de plus, elle donne instantanément et de façon continue l'évolution du flux net de sodium en fonction du temps. Cette méthode a rendu d'inestimables services dans l'étude de l'effet natriférique des hormones.

Deux hypothèses sont actuellement proposées pour expliquer l'effet natriférique des hormones neurohypophysaires : selon l'une, les hormones stimulent un mécanisme de transport actif pour le sodium (6, 15), selon l'autre, les hormones augmentent la perméabilité passive pour le sodium de la face muqueuse des cellules épithéliales, ce qui produit une stimulation indirecte du mécanisme de transport actif (14, 16).

Nous avons repris l'étude du mécanisme de l'effet natriférique des hormones neurohypophysaires. Nous avons choisi comme matériel la peau de la grenouille, car l'effet natriférique de ces hormones est plus marqué sur la peau que sur la vessie. L'ocytocine a été utilisée dans cette étude de préférence à la vasotocine, bien qu'elle soit l'hormone physiologique, car elle est difficile à se procurer et se conserve mal.

Nous avons, d'une part, obtenu par des techniques biophysiques (mesure du courant de court-circuit et de flux unidirectionnels) l'indication que l'ocytocine stimulait un mécanisme de transport

actif du sodium probablement localisé sur la face muqueuse des cellules. Nous avons en outre tenté d'étudier directement les systèmes de transport actif de sodium par des techniques biochimiques : en effet, comme cela a été montré sur d'autres tissus (cf Rev. 19) le système de transport actif de sodium est généralement tributaire de l'énergie fournie par l'hydrolyse de l'ATP ; dans une préparation où les cellules sont détruites et où un transport orienté ne peut plus être mis en évidence, l'activité du système de transport actif se manifeste par l'hydrolyse de l'ATP, et ses propriétés peuvent être étudiées directement par l'étude des caractéristiques de l'activité enzymatique de type ATPase associée. Pour pouvoir établir un lien entre une activité ATPasique et l'action natriférique de l'ocytocine, il était nécessaire de déterminer préalablement les étapes intermédiaires éventuelles du mécanisme d'action de l'hormone sur la face muqueuse. On sait en effet que l'hormone n'agit que quand elle est ajoutée au milieu séreux. Sur la vessie de crapaud, ORLOFF et HANDLER (17, 18) ont montré que l'AMP cyclique pouvait être l'intermédiaire intracellulaire de l'action des hormones neurohypophysaires. Nous avons donc été amenés à vérifier que l'AMP cyclique était également le médiateur intracellulaire de l'action natriférique de l'ocytocine. Ceci nous a permis de rechercher l'action de ce médiateur sur les fractions ATPasiques.

Ces études ont permis de mettre en évidence une activité ATPasique nouvelle dont l'activation par le sodium est modifiée par l'AMP cyclique. Il est suggéré que cette fraction pourrait être localisée à la face muqueuse des cellules. L'ensemble de ces résultats suggère que l'action natriférique de l'ocytocine implique, par l'intermédiaire de l'AMP cyclique, la stimulation d'un mécanisme de transport actif de sodium, localisé à la face muqueuse des cellules épithéliales.

Avant d'exposer nos résultats expérimentaux, nous avons jugé utile de résumer dans un premier chapitre les conceptions qui prévalent sur le mécanisme par lequel un flux net de réabsorption de sodium est produit à travers la peau.

CHAPITRE I

SCHEMA FONCTIONNEL DES CELLULES EPITHELIALES DE LA PEAU DE GRENOUILLE. METHODE DU COURANT DE COURT - CIRCUIT.

INTRODUCTION

Nous avons jugé utile de faire précéder l'exposé de nos résultats d'un résumé des travaux fondamentaux de USSING et de ses collaborateurs sur la peau de grenouille, afin de présenter le contexte des connaissances acquises dans ce domaine. En effet, les concepts qu'ils ont dégagés ont servi de base à tous les travaux postérieurs sur le transport des ions à travers les cellules épithéliales.

De plus, dans les chapitre II et III, nous avons utilisé constamment des préparations de peau dont la différence de potentiel était maintenue nulle par la méthode de court-circuit indiquée par USSING. Cependant, nos conditions expérimentales étaient parfois différentes de celles où la mesure du courant de court-circuit peut être utilisée comme mesure du flux net de sodium. Aussi il nous a paru nécessaire de rappeler le principe de cette méthode de court-circuit, afin d'en définir les possibilités et les limitations dans nos conditions expérimentales.

A. Modèle pour le fonctionnement de cellules assurant un transport actif trans-épithélial de sodium

Quand une peau de grenouille est isolée et montée entre deux chambres remplies avec des milieux dont la composition reproduit les conditions physiologiques (Ringer pour le milieu interne ou séreux, eau pour le milieu externe ou muqueux) il existe entre les deux faces de la peau une différence de potentiel. Cette propriété de la peau était déjà connue du temps de DU BOIS REYMOND (20). La différence de potentiel subsiste même si les deux faces

de la peau sont baignées par du Ringer. HUF, en 1935 (21), et KROGH, en 1937 (22), avaient mis en évidence une autre propriété singulière de la peau, celle de transporter du chlorure de sodium du milieu externe vers le milieu interne, même quand le milieu externe était très dilué. C'est à USSING (23) que revient le mérite d'avoir expliqué la relation entre ces deux propriétés et la nature des mécanismes en cause. En mesurant simultanément les flux entrant et sortant de sodium à l'aide d'isotopes radioactifs, il a montré que le transfert de sodium ne pouvait être expliqué que par l'existence d'un mécanisme transportant activement le sodium ; en effet, un flux net de sodium du milieu muqueux vers le milieu séreux subsiste lorsque la différence de potentiel, ou la différence de concentration entre les deux milieux créent un gradient de diffusion en sens contraire (23). En revanche, le transfert des chlorures se fait toujours dans le sens du gradient électrochimique ; le rapport des flux unidirectionnels est exactement celui qui est prévu par l'équation des flux établie par USSING (24) dans le cas d'un ion dont les mouvements sont passifs.

USSING a montré que la différence de potentiel qui rend compte du flux net de chlorure est due au mécanisme de transfert actif du sodium et aux propriétés particulières de perméabilité passive des deux faces de la peau. En effet, en l'absence d'anions diffusibles, il n'y a pas de transport de sodium et la perméabilité passive de l'épithélium pour les cations peut être étudiée.
La différence de potentiel à travers la peau croît avec la concentration de sodium dans le milieu muqueux, et décroît quand la concentration de potassium augmente dans le milieu séreux ; la face muqueuse se comporte comme une électrode réversible au sodium, tandis que la face séreuse se comporte comme une électrode réversible au potassium. Ceci indique que la face muqueuse est plus perméable au sodium qu'au potassium, tandis que la face séreuse est plus perméable au potassium qu'au sodium et que la différence de

potentiel à travers la peau résulte, au niveau de la face muqueuse du gradient de concentration pour le sodium, et au niveau de la face séreuse du gradient de concentration pour le potassium (25). La différence de perméabilité des deux faces de l'épithélium a été confirmée par l'étude des propriétés osmotiques de l'épithélium (26). L'existence des gradients de concentration pour le sodium et le potassium entre le milieu intracellulaire et les milieux muqueux et séreux, mis en évidence en l'absence d'anion diffusible, et le flux net de sodium en présence d'un anion diffusible, sont explicables par le même mécanisme. USSING a postulé l'intervention d'une "pompe" localisée à la face séreuse, transportant activement le sodium intracellulaire vers le milieu séreux en échange de potassium entrant dans les cellules. L'action d'une telle pompe rend compte du passage des ions sodium à travers la face séreuse (peu perméable au sodium) par un mécanisme de transport actif ; elle rend également compte de la différence de potentiel puisqu'elle maintient élevée la concentration intracellulaire de potassium et basse celle de sodium. Il existe une analogie de fonction entre cette pompe séreuse et le mécanisme de transport actif de sodium et de potassium qui existe dans la membrane cytoplasmique des cellules autres que les cellules épithéliales. Cependant, dans le cas de la peau, la différence de potentiel se produit entre les deux faces de l'épithélium, et non pas seulement entre le milieu intracellulaire et le milieu entourant la cellule.
Ceci est du au fait que les membranes intercellulaires des cellules épithéliales sont soudées entre elles au niveau des barres terminales, ce qui limite d'un côté une face muqueuse continue. Cette face muqueuse diffère des autres membranes cytoplasmique par sa perméabilité très faible au potassium.

Cette propriété empêche la diffusion du potassium intracellu-

laire dans le milieu muqueux. Comme cette face est assez perméable au sodium, USSING a proposé que l'entrée de sodium dans la cellule résulte d'une diffusion passive, à condition que le mécanisme de transport actif de sodium maintienne au niveau de cette face un gradient électrochimique favorable à la pénétration de sodium.

Le mécanisme du transport de chlorure de sodium à travers la peau tel qu'il est expliqué par USSING (cf 26) peut se résumer de la façon suivante :

- le sodium entre dans la cellule par la face muqueuse dans le sens de son gradient électrochimique.

- ce sodium est ensuite transporté activement de la cellule dans le milieu séreux en échange de potassium.

- ce potassium rediffuse seulement dans le milieu séreux dans le sens de son gradient électrochimique.

- le chlorure diffuse à travers tout l'épithélium dans le sens de son gradient électrochimique.

Comme il ne peut y avoir un transport net de charges d'un milieu dans l'autre, pour qu'il existe un flux net de sodium, il faut que ce flux net soit compensé par un flux net d'un autre cation en sens contraire, ou un flux net d'anion dans le même sens. Le flux net de sodium est donc limité par la perméabilité de la peau pour les diverses espèces ioniques présentes dans le milieu. USSING a montré que le flux net de chlorure était très voisin du flux net de sodium. C'est donc surtout la perméabilité de la peau au chlorure qui limite le flux net de sodium. Quand celle-ci est faible, ou en présence d'un anion imperméant, la différence de potentiel à travers la peau est élevée et le flux net de sodium faible ou nul. Au contraire, quand celle-ci est élevée,

la différence de potentiel est plus faible et le flux net de sodium plus grand.

B. Mesure du flux net de sodium par la méthode du courant de court-circuit

Du point de vue électrique, le mécanisme de transport actif est analogue à une pile, et la résistance offerte par la peau au passage du chlorure est analogue à une résistance shunt aux bornes de la pile. La condition de court-circuit établie par USSING et ZERAHN (14) est ainsi nommée car son principe est de rendre nulle la résistance du shunt, ce qui revient à mettre la pile en court-circuit. Cette condition est assurée en réalisant le shunt, non à travers la peau, mais par un circuit extérieur dont la résistance est surmontée à l'aide d'une différence de potentiel auxiliaire. Le courant extérieur passe par l'intermédiaire d'une électrode Ag -AgCl réversible au chlorure dans chacun des milieux, et provoque donc la soustraction d'ions chlorure dans un des milieux, et leur libération dans l'autre. La condition de court-circuit est réalisée quand la différence de potentiel est nulle entre les deux faces de la peau. Dans cette condition, l'intensité du courant de court-circuit mesure le bilan des mouvements de charges ioniques à travers la peau.

Dans le cas particulier où la composition ionique du milieu est identique de part et d'autre de la peau, la différence de potentiel étant nulle, il n'existe de gradient électrochimique pour aucun ion. Les flux entrant et sortant sont donc égaux pour tous les ions dont les mouvements à travers la peau sont passifs. USSING et ZERAHN (14) ont montré que dans cette condition le flux net de sodium n'était pas nul, ce qui confirme qu'il est activement transporté. En outre, le flux net de sodium est égal au courant de court-circuit, ce qui indique que le sodium est le

seul ion pour lequel existe un mécanisme de transport actif dans la peau. En conséquence le courant de court-circuit mesure le flux net de sodium.

Cependant, si une hormone, un agent pharmacologique, ou une condition expérimentale, produisent un effet sur le courant de court-circuit de la peau, avant de pouvoir dire s'il s'agit d'un effet natriférique, il est nécessaire de vérifier que cet effet n'est pas du à l'apparition d'un mécanisme de transport actif pour un ion autre que le sodium ; en effet, tout transfert net de charges se traduit par une modification du courant de court-circuit. Cette vérification peut se faire en déterminant le flux net de sodium par la mesure simultanée des flux entrant et sortant. Elle peut se réduire à la vérification de la corrélation entre la variation du flux entrant et la variation du courant de court-circuit dans le cas favorable où le flux sortant de sodium, mesuré indépendamment n'est pas modifié par la condition expérimentale dont on veut étudier l'effet. C'est cette dernière technique que nous avons employée dans les chapitres II et III.

CHAPITRE II

ROLE D'INTERMEDIAIRE DE L'AMP CYCLIQUE DANS L'ACTION DES HORMONES NEUROHYPOPHYSAIRES ; COMPARAISON AVEC L'ACTION DES CATECHOLAMINES

INTRODUCTION

ORLOFF et HANDLER, en 1961 (17), ont montré que l'adénosine 3' 5' -monophosphate cyclique (AMP cyclique) pouvait être le médiateur intracellulaire des actions hydrosmotique et natriférique de la vasopressine sur la vessie de crapaud. Il faut se rappeler que dans beaucoup de tissus d'animaux très divers existe une adénylcyclase membranaire catalysant la formation d'AMP cyclique à partir de l'ATP ; la concentration intracellulaire d'AMP cyclique est maintenue à un niveau bas (10^{-8} M) par l'action d'un autre enzyme, la phosphodiestérase, cytoplasmique mais présente dans les mêmes tissus, qui catalyse la transformation de l'AMP cyclique en 5' AMP ; la phosphodiestérase est inhibée par les méthylxanthines, en particulier par la théophylline. Voici le mécanisme d'action proposé par ORLOFF : la vasopressine stimule dans la membrane séreuse des cellules épithéliales l'activité adénylcyclasique, augmentant ainsi la concentration intracellulaire d'AMP cyclique ; cette augmentation provoque les réponses hydrosmotique et natriférique (cf Rev. 27).

Cette hypothèse lui a été suggérée par les travaux de RALL et SUTHERLAND qui avaient en 1958 (28) proposé un mécanisme analogue pour l'action glycogénolytique des catécholamines. Les étapes successives, depuis l'activation de l'adényl cyclase jusqu'à l'activation de la Phosphorylase b sont connues, et le mécanisme est maintenant complètement expliqué en ce qui concerne le muscle (29). Depuis, on a montré que la plupart des effets des catécholamines (parmi ceux qui impliquent l'intéraction de l'hormone avec les récepteurs de type β) sont dus à la stimulation d'une adénylcyclase. Il en est de même pour beaucoup

d'effets d'autres hormones (cf Rev. 30).

Les expériences rapportées dans ce chapitre sont destinées à vérifier si l'AMP cyclique joue également un rôle d'intermédiaire dans l'action natrifèrique de l'ocytocine sur la peau. Dans cette étude, le mode d'action des catécholamines pouvait éventuellement être utilisé comme terme de comparaison, à condition que ces hormones exercent sur la peau une action natrifèrique par l'intermédiaire des récepteurs β. En effet, USSING et ZERAHN (14) ont observé un effet natrifèrique des catécholamines. Cependant, comme les catécholamines provoquent aussi l'apparition d'un flux net sortant de chlorure (31), nous avons dû commencer par l'étude de ce processus.

Pour établir le mode d'action des catécholamines sur la peau, nous avons comparé l'action de la noradrénaline à celle de l'ocytocine sur les flux de sodium et de chlorure. A l'aide d'inhibiteurs spécifiques des récepteurs α et β, nous avons recherché quel type de récepteur était impliqué dans l'action de la noradrénaline. Puis nous avons vérifié que l'AMPcyclique remplissait les conditions nécessaires à un rôle d'intermédiaire dans l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur la peau : l'AMP cyclique doit reproduire les actions des deux hormones. Les hormones doivent stimuler l'activité adénylcyclasique.

La comparaison des réponses produites par les deux hormones, en fonction du temps et en fonction de la concentration, a permis d'autre part, de bien mettre en évidence ce qui était caractéristique des hormones neurohypophysaires et donc d'étudier, quoique de façon indirecte, leurs modalités d'action.

Techniques de mesure

La méthode du courant de court-circuit proposée par USSING et ZERAHN (14) a été utilisée pour mesure des flux net de sodium. Le dispositif à 6 voies mis au point par MOREL et al. (32) permet la mesure simultanée et indépendante du courant de court-circuit à travers six éléments de la surface de la peau ventrale disposés symétriquement deux à deux le long de l'axe antéro-postérieur de l'animal. La partie supérieure de l'appareil à 6 voies comporte en effet 6 chambres cylindriques disposées en couronne ; un support perforé de façon correspondante surmonte une chambre commune. Une peau montée dans cet appareil est séparée en 6 éléments d'une surface de 0,8 cm^2 isolés électriquement. Les six éléments sont, sur une face, en contact avec le milieu remplissant la chambre commune, contenant une électrode au calomel pour la mesure du potentiel et une électrode au chlorure d'argent pour le passage du courant servant à l'annulation de la différence du potentiel. L'autre face de chaque élément est baignée par le milieu contenu dans une chambre individuelle, contenant les deux types d'électrodes.

Le courant de court-circuit est ajusté et enregistré une fois par minute pour chaque élément de peau ; comme les réponses hormonales se développent pendant des temps d'1/4 d'heure à une heure, ce rythme est suffisant pour connaître la cinétique de la réponse, avec une bonne précision. L'étude simultanée des actions de l'ocytocine et de la noradrénaline a pu être réalisée en comparant l'action de chaque hormone sur des éléments symétriques de la même peau. En effet, le courant de court-circuit en l'absence d'hormone, l'amplitude de la réponse hormonale et même les concentrations d'hormones efficaces, sont extrêmement variables d'une peau à l'autre. Ces différents facteurs varient aussi au cours d'une expérience trop prolongée.

Des mesures de flux unidirectionnels de sodium et de chlorure

Le terme "élément" a été utilisé dans la suite de l'exposé pour désigner les éléments de la surface de la peau isolés grâce à ce dispositif.

sont faites avec les isotopes 24 Na et 36 Cl ajoutés en traceurs dans la chambre commune. Le contenu des chambres individuelles (3 ml) est prélevé entièrement à la fin de chaque période de mesure et remplacé par une quantité identique du même milieu. Pour la mesure des flux unidirectionnels entrant, la peau est montée la face muqueuse vers la chambre commune. Pour la mesure des flux unidirectionnels sortant, c'est la face séreuse qui est au contact de la chambre commune. Dans le cas où seul le flux de sodium est mesuré, la totalité du liquide prélevé est compté dans un compteur γ à cristal puits. Dans le cas où les deux isotopes 24 Na et 36 Cl ont été utilisés simultanément, une partie aliquote du liquide prélevé est déposée sur coupelle et évaporée à sec ; cet échantillon est compté une première fois, puis après un nombre suffisant de périodes pour que la radioactivité du 24 Na ait décru à 1 % de sa valeur initiale, le 36 Cl est mesuré dans un deuxième comptage (compteur β à bas bruit de fond). Le 24 Na est estimé par différence entre les deux comptages. La radioactivité spécifique est mesurée sur des prises du milieu de la chambre commune sur lesquelles, après dilution, une partie aliquote est comptée, le reste servant à la mesure de la concentration du sodium au photomètre de flamme. La concentration de chlorure n'a pas été mesurée directement ; dans le cas où la concentration de sodium n'était pas exactement de 112 mM, la concentration de chlorure a été corrigée en tenant compte du rapport des concentrations Cl^-/Na^+ dans le Ringer. Les flux ont été exprimés en μ A/Cm^2 pour faciliter la comparaison avec le courant de court-circuit.

Produits utilisés

Le Ringer utilisé pour baigner la préparation a la composition suivante : Na^+, 112 mM ; K^+, 3,2 mM ; Ca^{++}, 1 mM ; Mg^{++}, 1 mM ; Cl^-, 114 mM ; SO_4^{--}, 1 mM ; $H_2PO_4^-$, 1,2 mM ; HCO_3^-, 2 mM ; pH 7,9. La circulation du milieu et son oxygénation sont assurées par barbotage d'air.

L'ocytocine (Syntocinon, Sandoz) est diluée dans du Ringer. Une solution concentrée de noradrénaline (Rhône-Poulenc) est préparée dans de l'eau distillée, avec un volume égal d'acide ascorbique pour ralentir son oxydation spontanée ; la solution est diluée dans du Ringer immédiatement avant l'addition à la préparation. Nous avons vérifié que l'acide ascorbique aux concentrations utilisées est sans effet sur la peau. Le dichloro-isopropylartérénol (DCI) (Expandia), le Propranolol (Indéral), la phentolamine (Régitine CIBA), la Théophylline (Serlabo), sont dissous dans du Ringer ; l'AMP cyclique (Schwartz Bioresearch, Inc.) est dissous dans du Ringer et le pH ajusté à 7,9 avec de la soude.

Animaux

Les expériences ont été faites sur la peau ventrale de grenouilles Rana esculenta conservées à jeun à 2° puis adaptées au moins 48 h avant les expériences à 22°.

RESULTATS

A. Comparaison de l'action de la noradrénaline et de l'ocytocine sur le courant de court-circuit et les flux de sodium et de chlorure

Comparaison des réponses

Les effets de l'ocytocine et de la noradrénaline sur le courant de court-circuit et les flux unidirectionnels sont présentés sur les fig. 1 et 2. Les concentrations d'ocytocine et de noradrénaline ont été choisies pour donner une réponse sous-maximale.

Les flux sortants de sodium et de chlorure ne sont pas affectés par les deux hormones. Seul le flux entant de sodium augmente et son augmentation est similaire à celle du courant de court-circuit dans les deux cas.

TABLEAU I

COMPARAISONS DES EFFETS DE L'OCYTOCINE ET DE LA NORADRENALINE SUR LE COURANT DE COURT-CIRCUIT ET LES FLUX UNIDIRECTIONNELS DE SODIUM ET DE CHLORURE

Ce tableau donne les coefficients de corrélation (r) et les pentes (a) des droites de régression linéaire correspondant à la variation des flux unidirectionnels en fonction de l'augmentation du courant de court-circuit des points expérimentaux de la figure 3, le seuil de probabilité (P) pour que le coefficient de corrélation soit nul et que la pente soit non différente de 1 dans le cas du flux entrant de sodium, ou de 0 dans le cas des flux sortants de sodium (Fs Na^+) ou de chlorure (Fs Cl^-) est indiqué entre parenthèses.

	Ocytocine		Noradrénaline	
	r	a	r	a
Fe Na	0,997 ($P < 0,001$)	0,938 ($0,025 < P < 0,05$)	0,997 ($P < 0,001$)	0,963 ($0,1 < P < 0,2$)
Fs Na^+	0,239 ($P > 0,1$)	0,0355 ($0,2 < P < 0,4$)	0,226 ($P > 0,1$)	0,0100 ($0,2 < P < 0,4$)
Fs Cl^-	0,173 ($P > 0,1$)	-0,0414 ($0,4 < P < 0,5$)	0,324 ($P > 0,1$)	0,0368 ($0,1 < P < 0,2$)

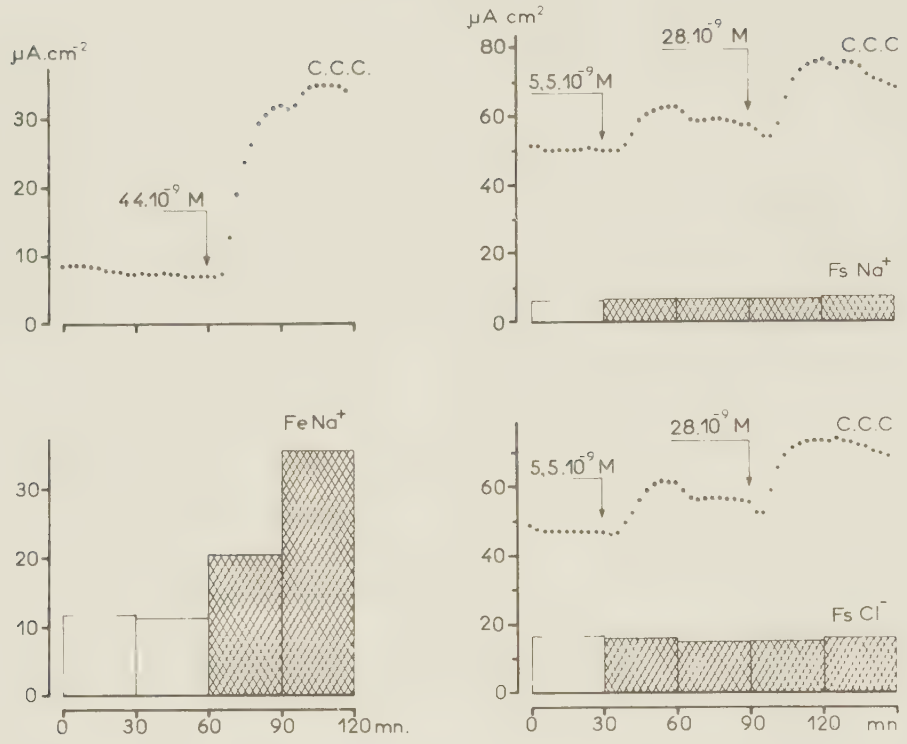


Fig. 1: Action de l'ocytocine sur le courant de court circuit (C.C.C.), le flux entrant de sodium (Fe Na^+) et les flux sortants de sodium (Fs Na^+) et de chlorure (Fs Cl^-).

Sur la partie gauche est reproduite une expérience où le ccc et le Fe Na^+ ont été mesurés et portés en $\mu A/cm^2$. Sur la partie droite est reproduite une expérience où le ccc, le Fs Na^+ et le Fs Cl^- ont été mesurés simultanément. Les flux sont mesurés pendant des périodes de 30 min. L'enregistrement du ccc est reproduit à raison d'un point toutes les 3 minutes.

TABLEAU II

ACTION DE LA NORADRENALINE (3.10^{-5} M) SUR LES FLUX UNIDIRECTIONNELS DE SODIUM ET DE CHLORURE

Les valeurs numériques sont des moyennes de 12 déterminations (mesures effectuées sur 6 éléments indépendants de 2 préparations). Les flux de sodium et de chlorure ont été mesurés simultanément. Les flux entrant et sortant ont été mesurés sur des préparations différentes. Les valeurs moyennes du courant de court-circuit (C.C.C.) correspondant à ces deux séries expérimentales sont indiquées dans les Colonnes 5 et 8.

Temps (min.)	Traitement	Flux entrant ($\mu A.cm^{-2}$)		C.C.C. ($\mu A.cm^{-2}$)	Flux sortant ($\mu A.cm^{-2}$)		C.C.C. ($\mu A.cm^{-2}$)
		Na^+	Cl^-		Na^+	Cl^-	
0-30	Témoin	34.30	25.36	26.08	5.57	10.84	15.84
30-60	Témoin	31.91	22.84	23.84	6.18	12.25	14.72
60-90	Noradrénaline 3.10^{-5} M	48.02	54.25	30.81	30.89	46.62	27.53
90-120		43.40	67.30	24.12	19.97	35.04	20.89
120-150		43.71	66.00	26.11	16.96	28.16	20.50

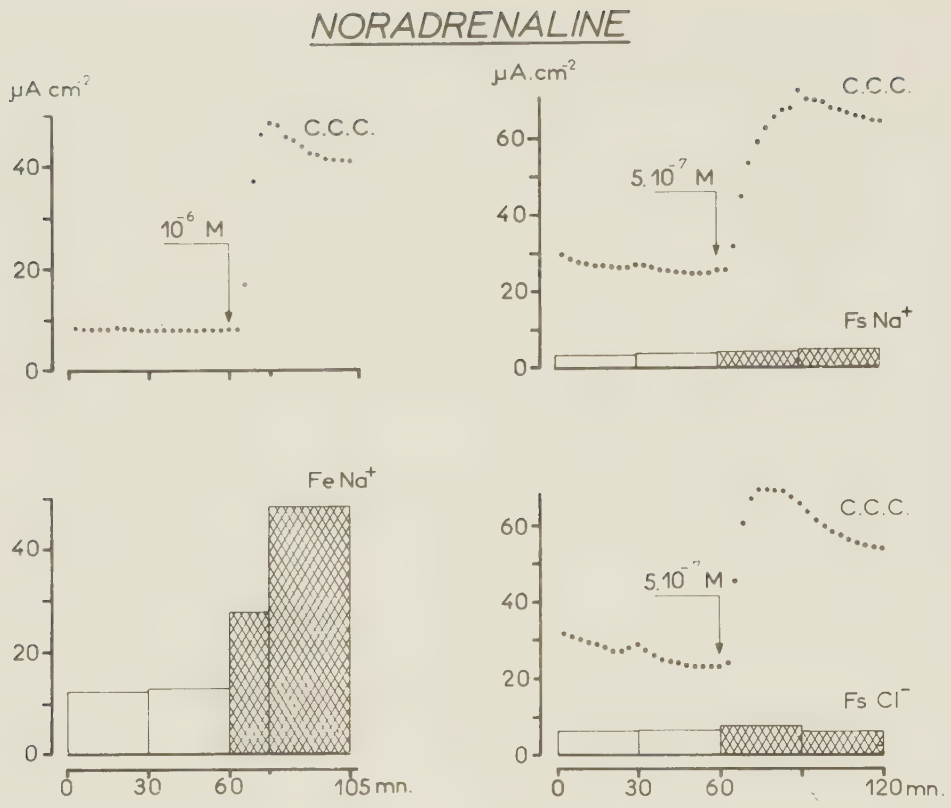


Fig. 2: Action de la noradrénaline sur le courant de court circuit (C.C.C.) le flux entrant de sodium (Fe Na^+) et les flux sortants de sodium (Fs Na^+) et de chlorure (Fs Cl^-).

Les expériences sont présentées de façon identique aux expériences effectuées avec l'ocytocine reproduites sur la Fig.1.
Le Fs Na^+ et le Fs Cl^- ont été mesurés au cours d'expériences différentes.

Variation des flux unidirectionnels en fonction de l'augmentation du courant de court-circuit

Pour préciser la correspondance entre l'augmentation du courant de court-circuit et celle du flux entrant de sodium, nous avons essayé l'action de différentes concentrations hormonales, de 10^{-9} à 5.10^{-8} M pour l'ocytocine, et de 10^{-8} à 10^{-6} M pour la noradrénaline, de façon à échelonner les réponses, depuis des réponses juste liminaires jusqu'à des réponses maximales.

Pour chaque réponse, la différence entre le flux mesuré pendant la période suivant le développement de la réponse (4è période) et le flux témoin pendant la période précédant l'action de l'hormone (2è période) a été mesurée, ainsi que l'augmentation du courant de court-circuit moyen pendant ces périodes (le courant de court-circuit moyen a été calculé à partir de la surface de la courbe mesurée au planimètre).

La figure 3 présente l'ensemble des résultats sous forme de corrélation entre les variations des divers flux unidirectionnels et l'augmentation correspondante du courant de court-circuit. Le tableau I donne les coefficients de corrélation et les pentes des droites de régression linéaire , établies par la méthode des moindres carrés, pour les points expérimentaux de la figure 3. Les droites de régression linéaire ont une pente nulle dans le cas du flux entrant de chlorure, des flux sortants de sodium et de chlorure ce qui signifie qu'il n'y a aucune proportionnalité entre les variations de ces flux (dues probablement à une dérive en fonction du temps et aux erreurs expérimentales) et l'augmentation du courant de court-circuit. Au contraire, la pente de la droite de régression linéaire dans le cas du flux entrant de sodium n'est pas significativement différente de 1, et le coefficient de corrélation est très voisin de 1, ce qui indique que l'augmentation du flux entrant de sodium est égale à l'augmenta-

tion du courant de court-circuit, pour l'ocytocine et pour la noradrénaline, dans tout le domaine de concentrations exploré. Dans ce domaine, l'action de la noradrénaline sur le courant de court-circuit est une action natriférique impliquant, comme celle de l'ocytocine une augmentation du flux entrant de sodium.

Effet de concentrations élevées de noradrénaline

La concentration de noradrénaline utilisée par USSING (31) dans son étude de l'action de cette hormone (3.10^{-5} M) ne fait pas partie du domaine de concentrations étudié précédemment puisque les réponses maximales sont atteintes pour des concentrations de 10^{-6} M. Comme ses résultats diffèrent de ceux que nous avons obtenu pour des concentrations inférieures, nous avons essayé l'effet de cette concentration dans nos conditions expérimentales. Les résultats de mesure des flux entrants et des flux sortants de deux expériences sont présentés sur la figure 4.

On observe une augmentation modérée et de courte durée du courant de court-circuit, suivie le plus souvent d'une redescente en-dessous du niveau avant stimulation. En plus de l'augmentation du flux entrant de sodium, on observe une très forte augmentation du flux sortant de sodium et des flux entrant et sortant de chlorure. Le tableau II résume les résultats obtenus. Dans la suite du travail les concentrations de noradrénaline utilisées ont été choisies dans le domaine de 10^{-8} à 10^{-6} M pour lequel la réponse sur le courant de court-circuit reflète seulement une augmentation du flux entrant de sodium.

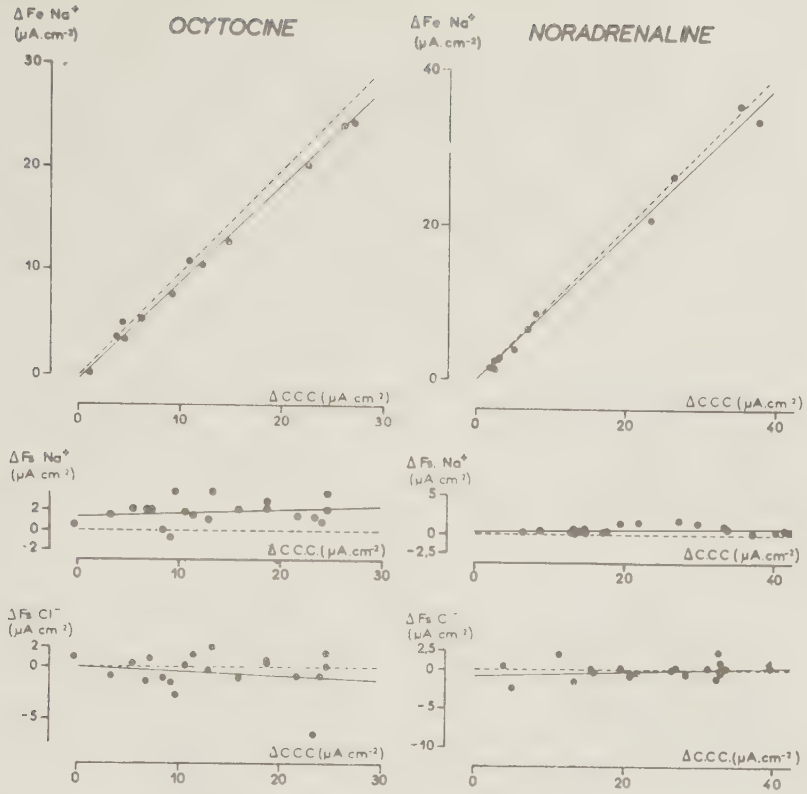


Fig. 3: Comparaison des action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur le courant de court-circuit et les flux unidirectionnels de sodium et de chlorure.

Pour chaque flux unidirectionnel, l'effet de l'hormone est calculé par la différence entre le flux mesuré pendant la période suivant le développement de la réponse hormonale (période 4, Cf. Fig. 2), et le flux mesuré pendant la période témoin précédant l'addition d'hormone (période 2); cette différence (Δ) est portée en fonction de l'augmentation du courant de court-circuit correspondante (Δ C.C.C.) obtenue pour des concentrations d'ocytocine et de noradrénaline choisies de façon à avoir une gamme de réponses depuis des réponses juste liminaires jusqu'à des réponses maximales. La pente des droites de regression linéaire (en traits pleins) ont été comparées à une droite de pente 1 (en pointillés) dans le cas du flux entrant de sodium (Δ Fe Na^+), à une droite de pente 0 dans le cas des flux sortants de sodium (Δ Fs Na^+) et de chlorures (Δ Fs Cl^-).

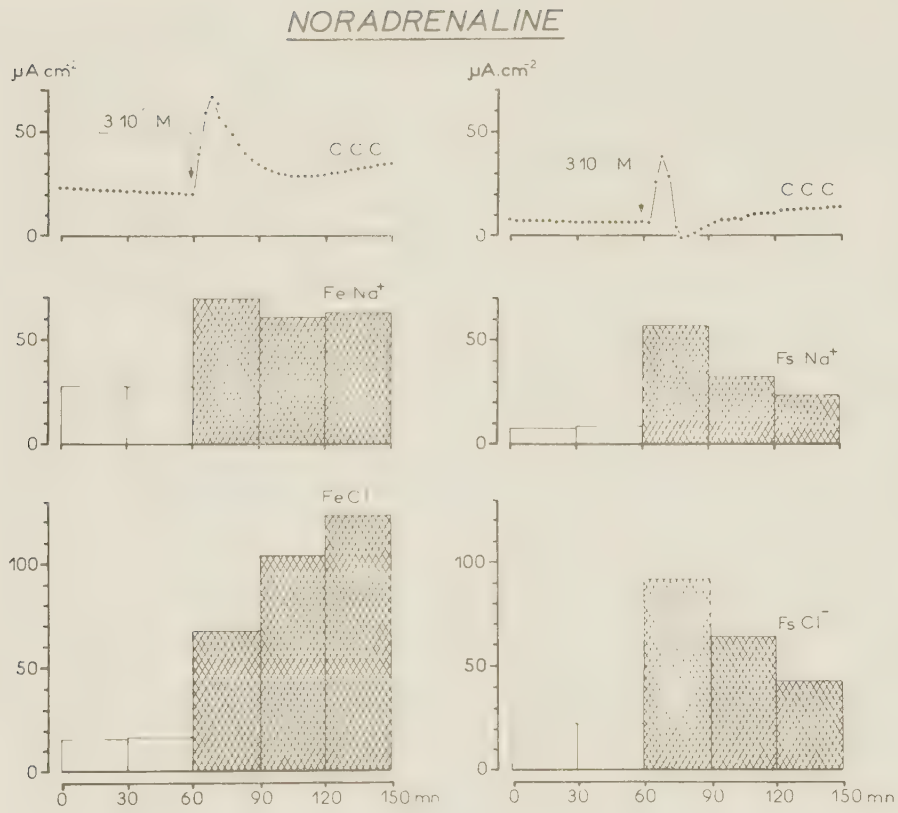


Fig. 4: Action d'une forte concentration de noradrénaline (3.10^{-5}M) sur le courant de court-circuit (C.C.C.) et les flux unidirectionnels de sodium et de chlorures.

Sur la partie gauche est reproduite une expérience où le C.C.C. et les flux entrants de sodium ($Fe\ Na^+$) et de chlorures ($Fe\ Cl^-$) ont été mesurés simultanément. Les flux sont mesurés pendant des périodes de 30 min. et portés en $\mu A/cm^2$; l'enregistrement du C.C.C. est reproduit à raison de un point toutes les 3 min.

Sur la partie droite est reproduite de la même manière une expérience où le C.C.C. et les flux sortants de sodium ($Fs\ Na^+$) et de chlorure ($Fs\ Cl^-$) ont été mesurés simultanément.

En comparant avec la Fig. 2, on remarquera que cette concentration de noradrénaline, 30 fois supérieure à la concentration nécessaire pour obtenir une réponse maximale, provoque une augmentation rapide et transitoire du courant de court-circuit, liée à une augmentation des flux unidirectionnels de Na^+ et de Cl^-.

B. Dissociation des récepteurs à l'ocytocine et à la noradrénaline

Action des inhibiteurs de l'action des catécholamines

L'action inhibitrice du Dichloroisopropylartérénol (DCI) sur les récepteurs de type β du coeur a été décrite par POWELL et SLATER (33). Sur la peau, le DCI (10^{-4} M) a une certaine action natriférique propre, dont l'intensité est variable d'une expérience à l'autre (cf Tableau III), mais toujours inférieure à l'intensité des réponses maximales produites par l'ocytocine ou la noradrénaline. Cette action est irréversible : elle subsiste plusieurs heures même après des rinçages répétés. Le protocole expérimental employé pour l'étude de ses effets est illustré sur la figure 5. Après avoir obtenu des réponses à l'ocytocine et à la noradrénaline, le DCI (10^{-4} M) est ajouté à la préparation ; après 1/2 heure, le temps nécessaire au développement de son action, les reponses aux mêmes concentrations d'ocytocine et de noradrénaline sont comparées aux premières. Le tableau III présente les résultats obtenus.
Le DCI supprime complètement l'action de la noradrénaline alors que la réponse à l'ocytocine subsiste.

Par la suite, nous avons essayé un autre inhibiteur des récepteurs β : le Propranolol ; sa fixation est irréversible comme celle du DCI, mais il est dépourvu d'action propre. La figure 6 montre un exemple de son action : l'action de la noradrénaline est inhibée, la réponse à l'ocytocine est inchangée (le résultat est plus clair que dans le cas précédent où l'action de l'ocytocine se supperposait avec celle du DCI).

L'action de la phentolamine, un inhibiteur des récepteurs α a été essayée selon le même protocole, si ce n'est que la phentolamine a été laissée au contact de la peau pendant toute la deuxième partie de l'expérience (figure 7). La phentolamine ne modifie ni le courant de court-circuit de base ni les réponses hormonales.

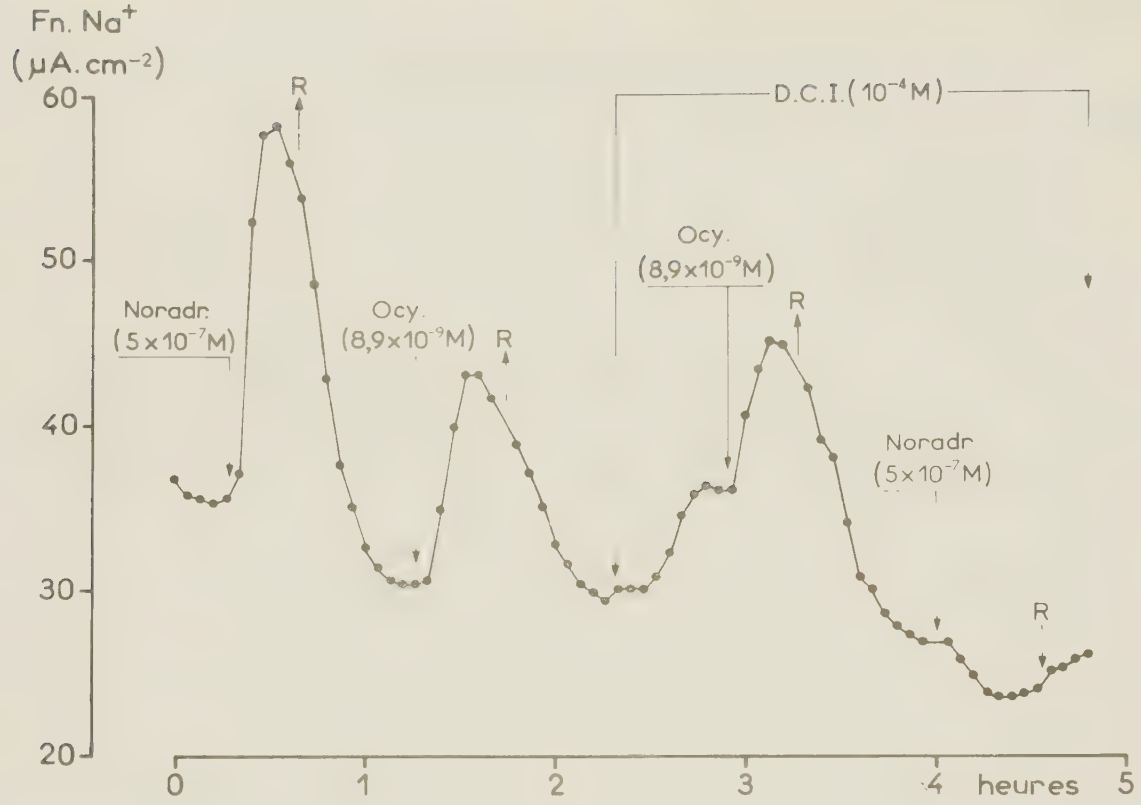


Fig. 5: Effet du DCI, inhibiteur des récepteurs β, sur les réponses à l'ocytocine et à la noradrénaline.

L'amplitude des réponses est comparée avant et après traitement par le DCI, pour une concentration d'ocytocine ou de noradrénaline donnant une réponse non maximale. L'évolution du courant de court-circuit ($Fn. Na^+$) en fonction du temps est reproduite à raison d'un point toutes les 4 min.

TABLEAU III

EFFET DU DCI SUR L'ACTION DE LA NORADRENALINE OU DE L'OCYTOCINE SUR LE TRANSPORT ACTIF DE SODIUM SUR LA PEAU

Le tableau donne successivement: l'effet du dichloroisopropylartérénol (DCI): augmentation du courant de court-circuit ($\Delta Fn.\ Na^+$) au dessus du niveau de base; les effets de la noradrénaline mesurés avant (DCI:o) et après traitement par le DCI (+ DCI); les effets de l'ocytocine mesurés avant et après traitement par le DCI; les valeurs portées au bas des colonnes sont des moyennes accompagnées de leur déviation standard. Les valeurs moyennes des effets de la noradrénaline et de l'ocytocine mesurés en présence de DCI ont été comparées à o.

DCI (10^{-4}M) $\Delta Fn.Na^+$ ($\mu A.cm^{-2}$)	Noradrénaline			Ocytocine		
	Concentration (μM)	$\Delta Fn.\ Na^+$ ($\mu A.cm^{-2}$)		Concentration (mμM)	$\Delta Fn.\ Na^+$ ($\mu A.cm^{-2}$)	
		DCI:o	+ DCI 10^{-4} M		DCI:o	+ DCI 10^{-4} M
3.24	0.1	20.82	1.00	8.90	13.34	6.73
3.24	0.1	24.81	0.62	8.90	16.45	10.47
7.60	0.1	25.43	- 4.49	4.45	10.32	5.61
2.12	0.1	16.20	- 1.12	4.45	4.97	2.49
23.43	0.1	23.68	- 0.50	8.90	12.71	6.98
14.21	0.1	9.72	- 0.50	8.90	9.47	5.48
24.68	0.1	20.69	0	8.90	6.98	2.49
4.49	0.5	20.94	1.99	8.90	9.97	4.99
6.98	0.5	24.18	- 3.74	8.90	13.46	8.97
10.0		20.7	- 1.2		10.9	6.0
±8.7		±5.0	± 1.9		±3.5	±2.7
			t = 1.893			t = 6.807
			0.1 >P >0.05			P < 0.001

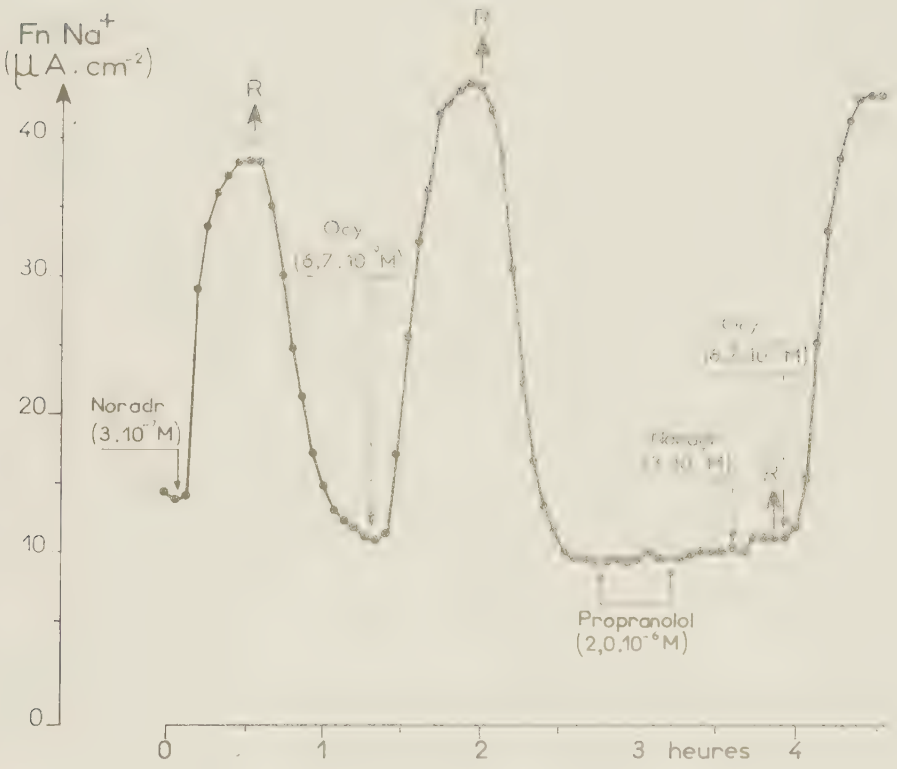


Fig. 6: Effet du Propranolol, inhibiteur des récepteurs β, sur les réponses à l'ocytocine et à la noradrénaline (Cf. légende Fig. 5).

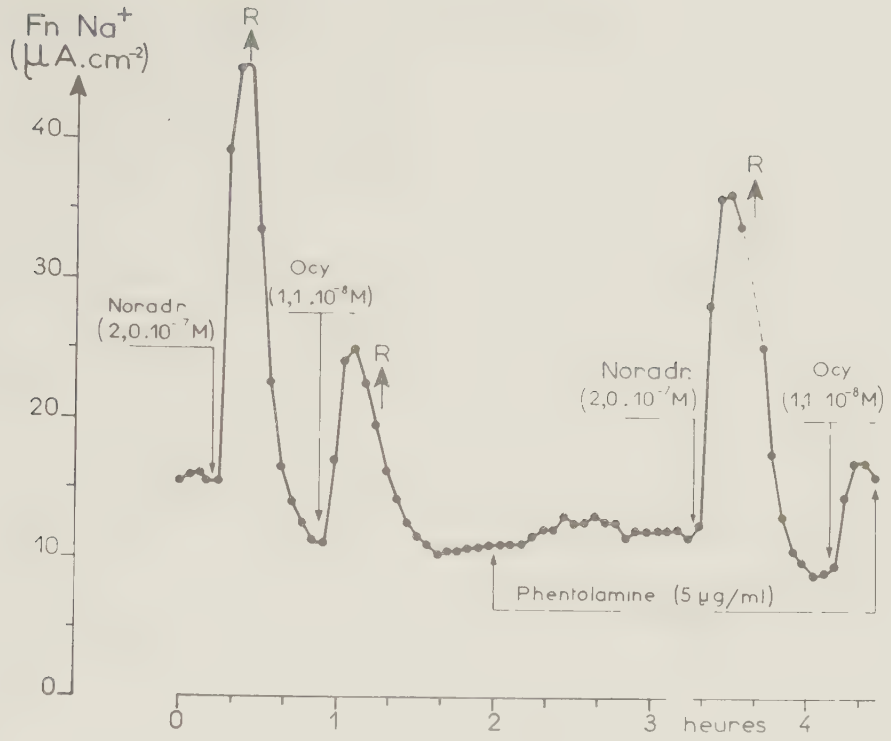


Fig. 7: Effet de la Phentolamine, inhibiteur des récepteurs α, sur les réponses à l'ocytocine et à la noradrénaline (Cf. légende Fig. 5).

Autres arguments impliquant une dissociation des récepteurs à l'ocytocine et à la noradrénaline

Une observation faite sur l'amplitude des réponses à l'ocytocine et à la noradrénaline au cours des expériences précédentes indique que les récepteurs aux deux hormones sont distribués différemment selon les régions de la peau : les réponses à une même concentration d'ocytocine sont peu différentes pour les éléments antérieurs de la peau ventrale et pour les éléments postérieurs, alors que la réponse à la noradrénaline est plus forte sur les éléments postérieurs. La figure 8 où sont reproduits les enregistrements de court-circuit d'un élément antérieur et d'un élément postérieur de la même peau montre cette dissociation. Pour une série de 10 expériences le rapport de la réponse de l'élément postérieur sur celle de l'élément antérieur est en moyenne de 1,54 ± 0,75 dans le cas de l'ocytocine et de 2,93 ± 1,09 dans le cas de la noradrénaline.

Il est également possible de mettre en évidence une dissociation des récepteurs à l'ocytocine et à la noradrénaline sur le même élément de peau : les effets maximaux sont très voisins pour l'ocytocine et la noradrénaline. Ceci pourrait être dû, soit à la saturation des récepteurs, soit à une limitation du transport si la capacité maximale de transport de sodium est atteinte. Nous pouvons exclure cette dernière hypothèse car si on ajoute de la théophylline, dont nous verrons ultérieurement le mécanisme d'action, à un élément pour lequel une réponse maximale est atteinte, le courant de court-circuit est augmenté. Aussi, lorsque des concentrations croissantes d'ocytocine sont ajoutées à la préparation jusqu'à ce que la réponse n'augmente plus, on peut admettre que l'effet maximum alors atteint indique que tous les récepteurs à l'ocytocine sont saturés. La noradrénaline, dans cette condition, produit une nouvelle augmentation de la réponse (cf. fig. 9) comparable à celle obtenue dans le cas de la théophylline, et limitée cette fois par la capacité maximale de transport.

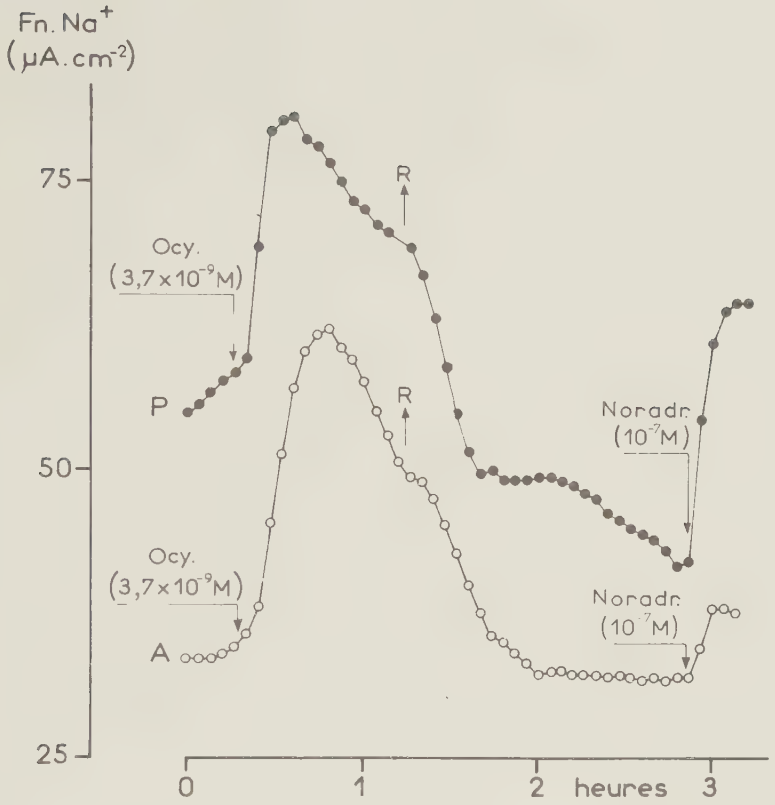


Fig. 8: Comparaison des réponses à l'ocytocine et à la noradrénaline, en fonction de la localisation de l'élément de peau.

L'enregistrement du courant de court circuit est reproduit à raison d'un point toutes les 4 min. L'élément A (points blancs) est localisé sur la peau ventrale au niveau des pattes antérieures; la réponse à la noradrénaline de cet élément est inférieure à celle de l'élément P localisé au niveau des pattes postérieures (points noirs).

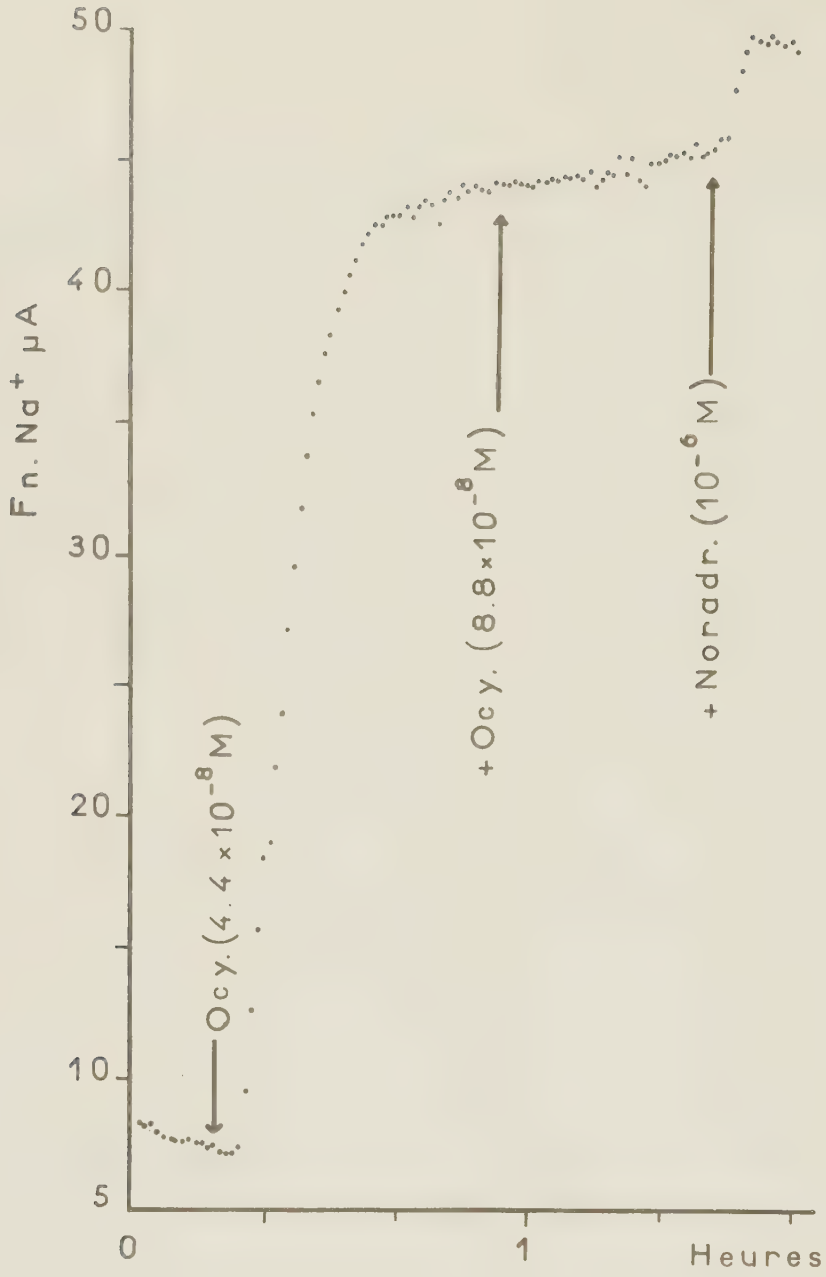


Fig. 9: Additivité des réponses maximales de l'ocytocine et de la noradrénaline.

La figure reproduit l'enregistrement du courant de court circuit (Fn Na^+) en fonction du temps; au moment indiqué par la première flèche, une quantité d'ocytocine produisant une réponse maximale est ajoutée à la préparation. Si on ajoute une deuxième fois la même quantité d'ocytocine (la concentration dans le milieu est X 2) il n'y a pas d'augmentation supplémentaire du courant de court circuit, mais l'addition d'une quantité de noradrénaline produisant une réponse juste maximale (inférieure à celle produisant un effet sur les récepteurs α) entraîne une réponse supplémentaire.

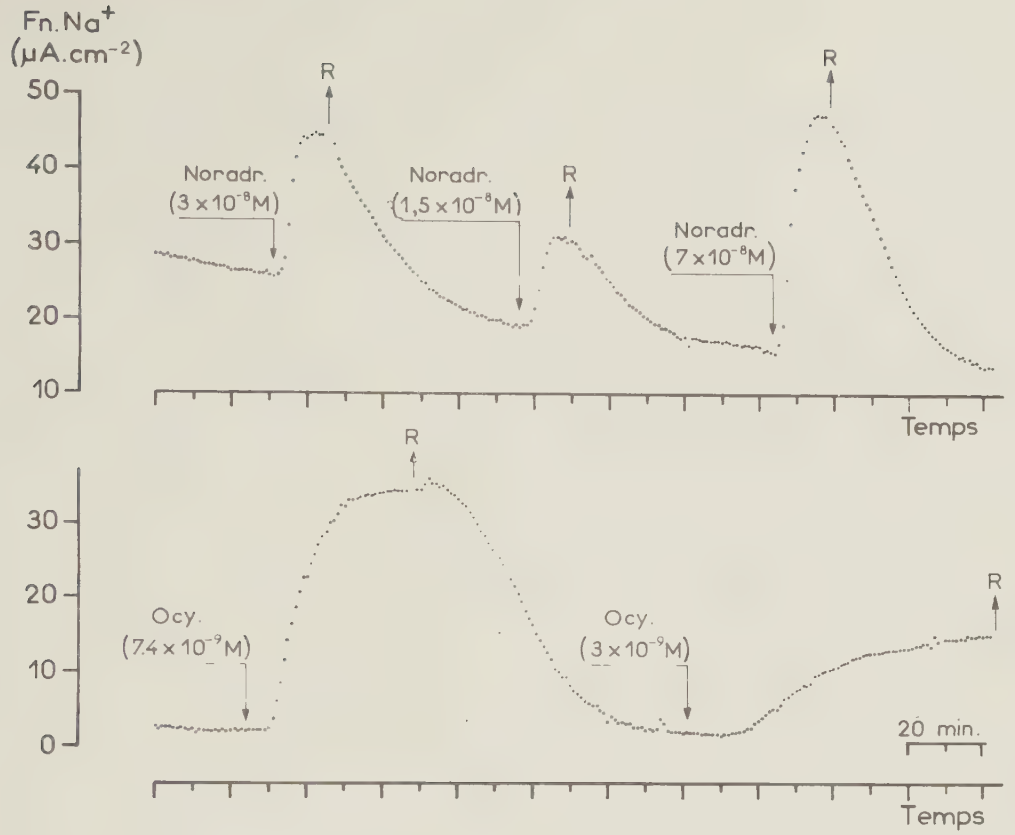


Fig. 10: Effet natriférique de la noradrénaline et de l'ocytocine.

La partie supérieure de la figure représente une partie de l'enregistrement du courant de court circuit (1 point par min.) d'une expérience où diverses concentrations de noradrénaline ont été ajoutées à la préparation, de façon à déterminer l'amplitude de la réponse en fonction de la concentration de noradrénaline.

La partie inférieure de la figure représente une partie d'une expérience analogue concernant l'ocytocine. La réponse est beaucoup plus rapide dans le cas de la noradrénaline que dans le cas de l'ocytocine.

Comparaison des cinétiques de réponses à la noradrénaline et à l'ocytocine

La réponse à la noradrénaline est plus rapide que celle à l'ocytocine (cf. fig. 10). Il est possible de préciser cette différence en mesurant le temps au bout duquel le courant de court-circuit a atteint la moitié de l'amplitude de la réponse complète (t 1/2). Pour 10 expériences où l'ocytocine et la noradrénaline donnaient des réponses d'amplitude comparable, le t 1/2 est de 8,8 min. pour l'ocytocine et 5,9 min. pour la noradrénaline; la différence moyenne $d = 2,9 \pm 1,5$ min. est significativement différente de zéro ($P < 0,001$).

Comparaison des relations entre l'amplitude de la réponse et la concentration pour les deux hormones

Dans le cas de la noradrénaline, 7 à 8 concentrations différentes d'hormones ont été essayées dans un ordre aléatoire sur le même élément de peau. Les réponses sont séparées par des périodes de rinçage.

Dans le cas de l'ocytocine, le temps de la réponse et du rinçage étant beaucoup plus long (cf. fig. 10), d'autres protocoles expérimentaux ont été utilisés. - 1 : on procède de la même façon que dans le cas de la noradrénaline, mais en répartissant les diverses concentrations sur deux éléments symétriques, en vérifiant au début et à la fin de l'expérience que des réponses identiques sont obtenues sur les deux éléments avec la même concentration d'ocytocine. 2 - on procède de la même façon, mais en utilisant les 6 éléments de la peau, dans le cas où ceux-ci répondent de façon identique à la même concentration d'hormone. 3 - sur un seul élément, les amplitudes desréponses à des concentrations croissantes d'ocytocine sont mesurées successivement, sans période de rinçage entre chaque concentration (courbes cumulées). Ces trois méthodes donnent des résultats identiques.

Un exemple de la relation entre l'amplitude de la réponse du

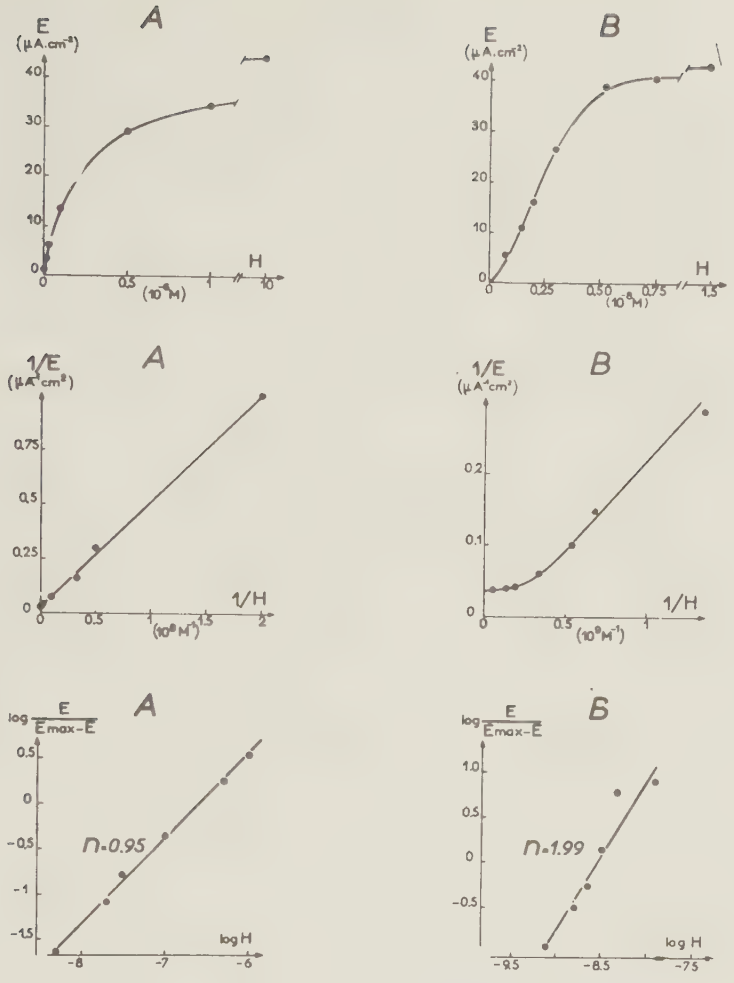


Fig. 11: Relation entre l'amplitude de l'effet natriférique et la concentration d'hormone.

A: Noradrénaline; B: Ocytocine. A la partie supérieure, l'effet natriférique (E) en fonction de la concentration d'hormone (H). Au milieu, représentation en inverse des mêmes points expérimentaux A la partie inférieure, représentation de HILL.

courant de court-circuit et la concentration d'hormone est présentée sur la figure 11. Cette relation est sigmoïde dans le cas de l'ocytocine et hyperbolique dans le cas de la noradrénaline. Représentée dans les coordonnées en inverse, la relation dans le cas de la noradrénaline est bien transformée en droite, ce qui confirme sa nature hyperbolique. Dans le cas de l'ocytocine, cette représentation fait apparaitre une déviation systématique pour les fortes concentrations.

Pour l'analyse de la relation sigmoïde obtenue dans le cas de l'ocytocine, nous avons utilisé le système de coordonnées de HILL (34) (cf. fig. 11 partie inférieure) cette représentation transforme une relation hyperbolique en une droite de pente 1. Appliquée à une courbe sigmoïde : celle du % de saturation de l'hémoglobine en fonction de la pression partielle d'oxygène, cette représentation donne une droite de pente supérieure à 1. Elle a été appliquée à l'analyse des vitesses de réaction d'enzymes allostériques en fonction de la concentration de substrat. Dans les coordonnées de HILL, la relation dans le cas de la noradrénaline est une droite de pente (n) voisine de 1. Dans le cas de l'ocytocine, la pente est supérieure à 1 ; le tableau IV présente les valeurs expérimentales de n.

C. Rôle d'intermédiaire de l'AMP cyclique dans l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline

Actions natriférigues de l'AMP cyclique et de la théophylline

La figure 12 montre plusieurs exemples d'action de l'AMP cyclique et de la théophylline sur le courant de court-circuit.

L'AMP cyclique, à des concentrations beaucoup plus élevées (5.10^{-4} à 5.10^{-3} M) que les concentrations intracellulaires, et la théophylline reproduisent les actions natriférigues de l'ocytocine et de la noradrénaline.

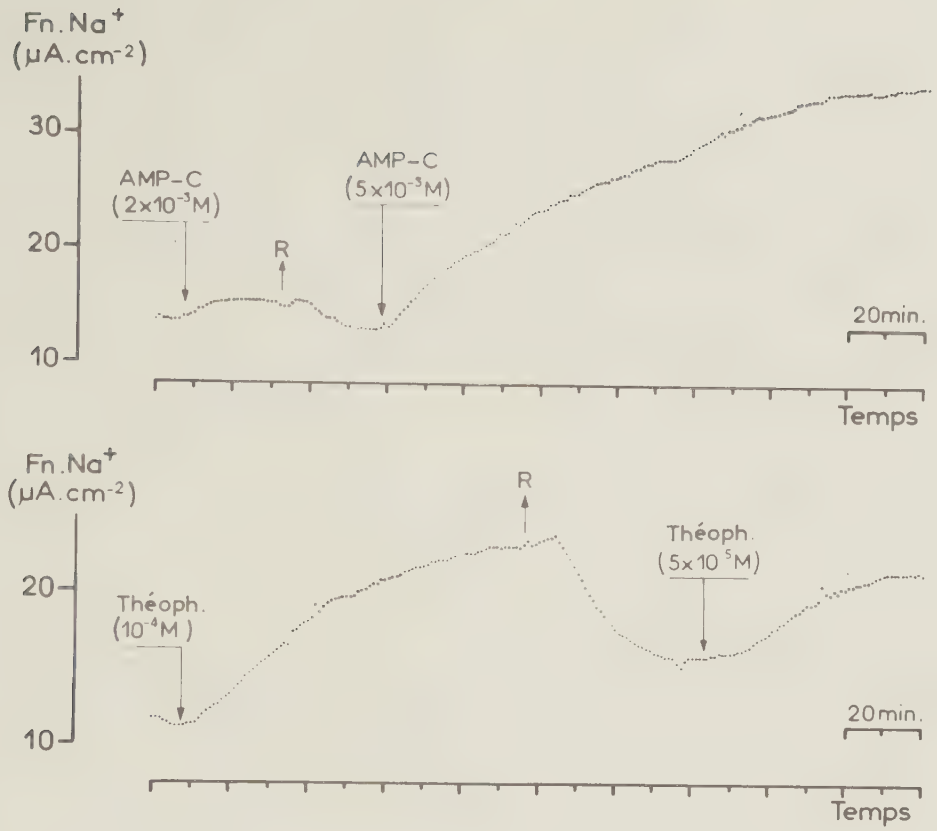


Fig. 12: Actions natrifériques de l'AMP cyclique et de la Théophylline.

Enregistrement du courant de court-circuit (Fn Na^+), en fonction du temps (1 point par min.) au cours de 2 expériences où l'action de concentrations différentes d'AMP cyclique (AMP.C) ou de Théophylline (Théoph.) ont été étudiées.

TABLEAU IV

VALEURS DES PENTES DES DROITES OBTENUES DANS LE MODE DE REPRESENTATION DE HILL

Les valeurs numériques de n représentent pour l'ensemble des expériences les pentes des droites de régression linéaire entre log $E/(E_{max} - E)$ et log H (coordonnées de HILL). Les valeurs moyennes de n ($\bar{n}$) sont comparées à 1.
E: effet natriférique; H:concentration d'hormone;(cf. Fig.11)

noradrénaline			ocytocine		
Exp. n°	Nombre de doses	n	Exp. n°	Nombre de doses	n
1	5	1.15	8	12	1.45
2	6	1.11	9	6	2.02
3+	7	0.95	10	6	1.59
4	5	0.97	11+	6	1.99
5	9	1.11	12	7	1.77
6	7	1.04	13	5	1.68
7	6	0.92	14	6	1.48
$\bar{n} = 1.04 \pm 0.09$			$\bar{n} = 1.71 \pm 0.23$		
$0.8 > P > 0.7$			$P < 0.001$		

+: Expériences utilisées sur la Fig 11.

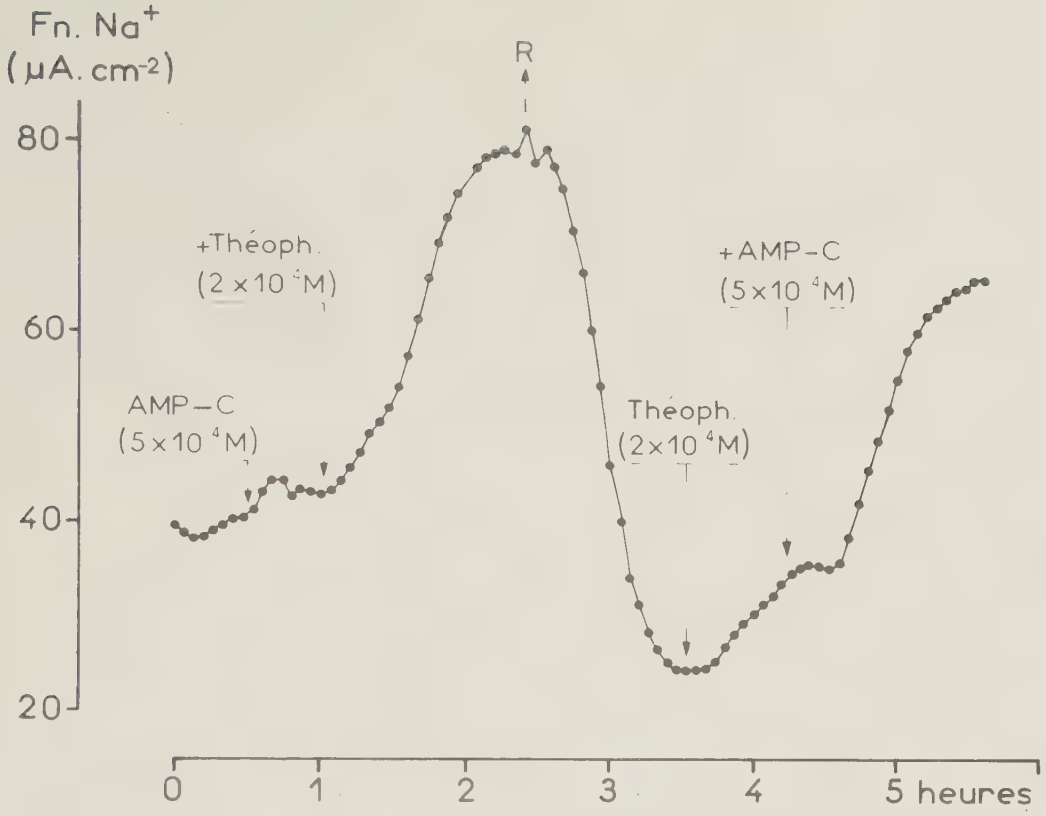
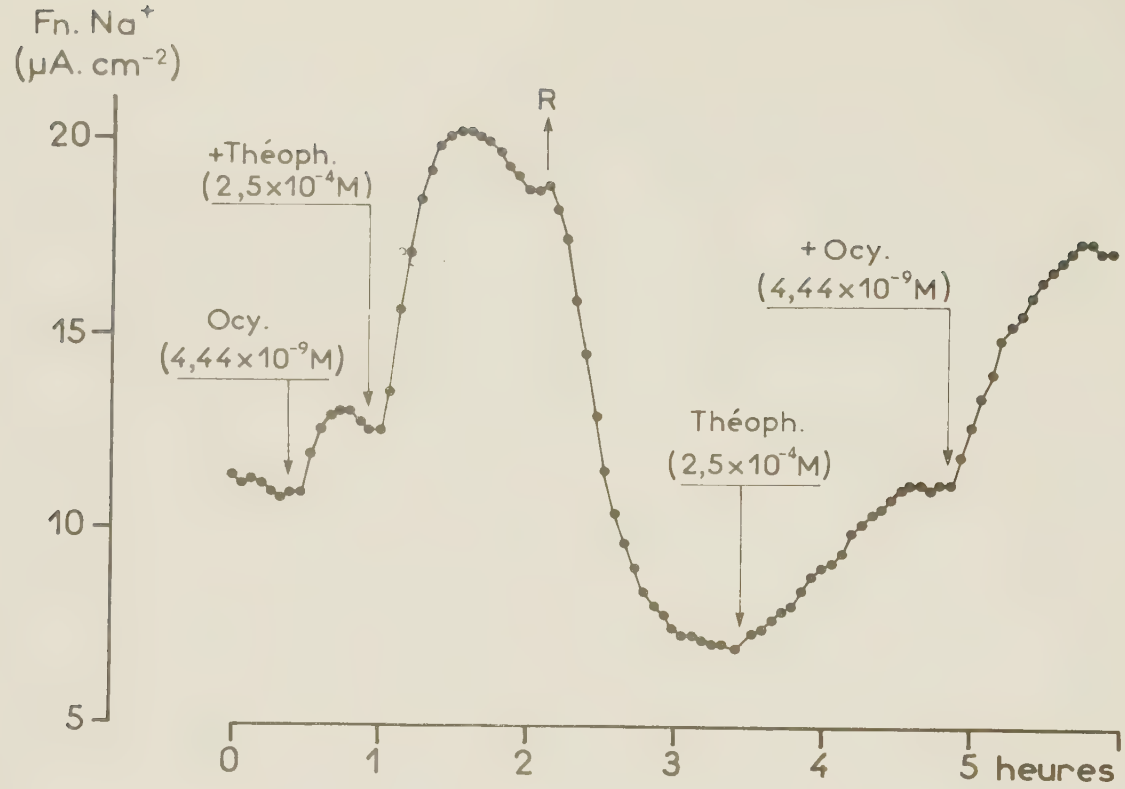


Fig. 13: Amplification de la réponse natriférique de l'AMP cyclique par la théophylline.

L'amplification est mise en évidence en comparant la somme des effets natriférigues obtenus en réponse à de faibles concentrations d'AMP cyclique et de théophylline à la réponse obtenue quand l'AMP cyclique et la théophylline sont présents simultanément.

L'enregistrement du courant de court-circuit (Fn Na^+) reproduit à raison d'un point toutes les 4 minutes, illustre la façon dont cette information est obtenue. Les concentrations d'AMP cyclique (AMPc) et de théophylline (Théoph.), choisies pour donner des réponses non maximales, sont indiquées sur la figure. L'ordre dans lequel ces agents sont ajoutés permet de déterminer: - l'effet propre de l'AMP cyclique, puis l'effet de la théophylline et de l'AMP cyclique, présents simultanément;
- l'effet propre de la théophylline, puis de nouveau l'effet des deux agents présents simultanément.



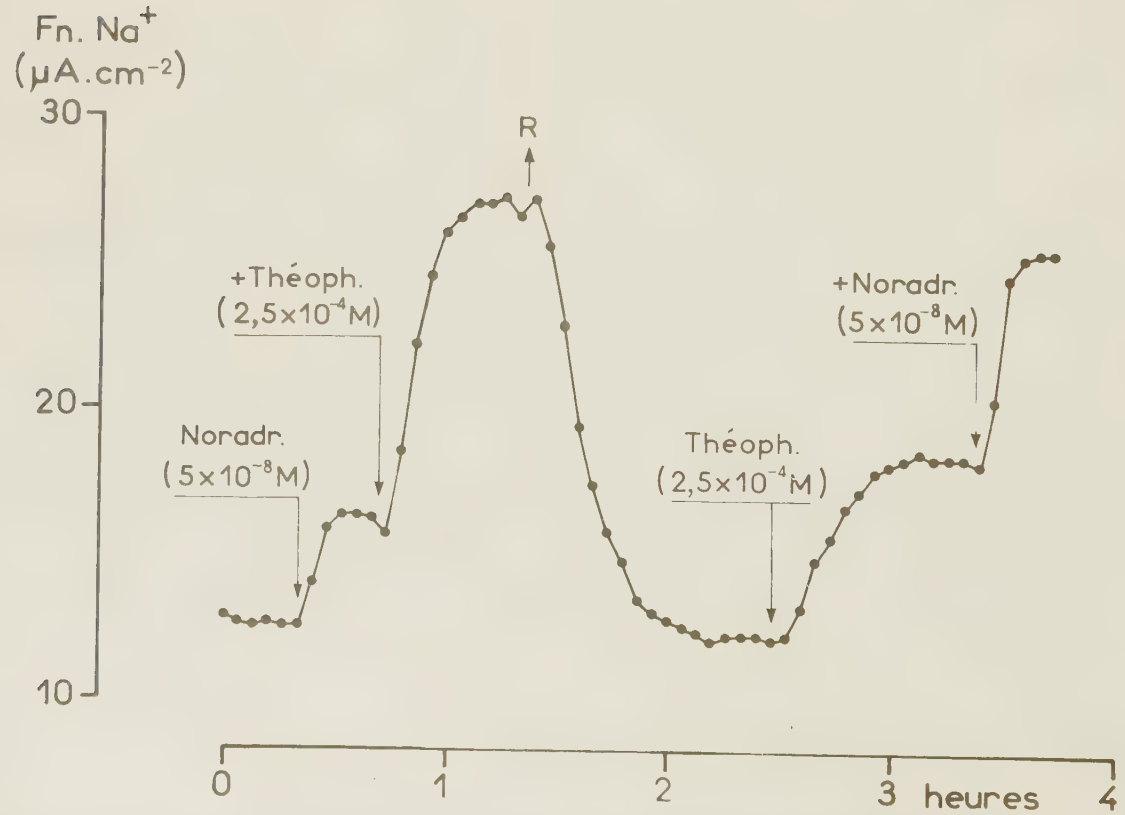


Figure 14: Amplification de l'effet natriférique de l'ocytocine et de la noradrénaline par la théophylline (cf. Fig. 13).

Amplification des réponses par la théophylline

La figure 13 montre que des concentrations d'AMP cyclique et de théophylline ayant, seules, des effets très petits, quand elles sont présentes simultanément, provoquent une réponse supérieure à celle qu'aurait donné une simple addition des réponses.

La théophylline amplifie donc les effets de l'AMP cyclique exogène.

Selon le même protocole expérimental, nous avons essayé l'effet de la théophylline sur des concentrations de noradrénaline et d'ocytocine donnant des réponses liminaires. La figure 14 montre un exemple pour chaque hormone.

Les effets de la théophylline ont été analysés dans cette série d'expériences en faisant le rapport entre la réponse (a) obtenue en présence à la fois de théophylline et d'AMP cyclique (ou d'hormone) et la somme (b) des réponses obtenues avec la théophylline et l'AMP cyclique (ou l'hormone) séparément. L'amplification se traduit par un rapport supérieur à 1. Le tableau V donne les moyennes des rapports a/b obtenus. L'amplification est d'autant plus grande que les effets propres représentent une fraction plus faible de la capacité maximum de transport de sodium pour l'élément de peau. Ceci explique que les rapports soient très dispersés : une éventuelle analyse statistique serait sans signification. L'amplification est la plus nette pour l'AMP cyclique exogène - cependant dans le cas de l'ocytocine et de la noradrénaline l'amplification de la réponse par la théophylline apparait dans chaque expérience.

TABLEAU V

Amplification des réponses par la Théophylline

	AMP -C	Ocytocine	Noradrénaline
a/b	4,2	1,7	1,3
Valeurs extrêmes	1,1 à 14,3	1,3 à 2,2	1,1 à 1,4
Nombre d'expériences	8	12	12

DISCUSSION

Les résultats obtenus avec différentes concentrations de noradrénaline montrent clairement qu'il y a sur la peau deux effets distincts. Entre 10^{-7} et 10^{-5} M la noradrénaline provoque une augmentation du courant de court-circuit qui croît avec la concentration d'hormone. Cet effet est dû à une stimulation du flux entrant de sodium, sans modification associée du flux sortant de sodium et des flux de chlorure. C'est donc une action natriférique tout à fait analogue à celle de l'ocytocine.

Au contraire, des concentrations plus élevées comme celle employée par USSING et al.(14,31)(3.10^{-5} M) font apparaître, en plus d'une augmentation du flux entrant de sodium, une augmentation des flux unidirectionnels de chlorure, et une augmentation du flux sortant de sodium. USSING observe dans cette condition l'apparition d'un flux net sortant de chlorure qu'il interprète par une stimulation de la sécrétion des glandes à mucus de la peau. Dans des expériences récentes faites sur une autre grenouille, Rana pipiens, BENSON et HADLEY (35) ont observé directement sous microscope la sécrétion des glandes de la peau isolée ; ils montrent que des concentrations de noradrénaline de 10^{-6} à 10^{-4} M sont nécessaires pour déclancher la sécrétion et que celle-ci est inhibée par les agents inhibant les récepteurs de type α et non ceux inhibant les récepteurs β des catécholamines. Il est donc probable, ainsi que le suggère USSING, que la noradrénaline à 3.10^{-5} M provoque la sécrétion des glandes de la peau de Rana esculenta, par l'intermédiaire de récepteurs α ; une telle action, se superposant à l'action natriférique, rendrait compte de l'augmentation des flux unidirectionnels de sodium et de chlorure.

GONZALEZ et al. (36) ont montré une action de la stimulation nerveuse du nerf brachial sur le courant de court-circuit de la peau chez le crapaud, analogue à celle des catécholamines. Ceci suggère que les catécholamines pourraient jouer un rôle physiologique sur la

peau par l'intermédiaire d'une libération au niveau des terminaisons nerveuses.

L'action de la noradrénaline sur le courant de court-circuit, aux concentrations comprises entre 10^{-7} et 10^{-5} M, est bloquée spécifiquement par le DCI et le Propranolol qui sont des inhibiteurs des récepteurs β des catécholamines, au contraire la phentolamine, inhibiteur des récepteurs α, est sans action.

Aux mêmes concentrations, la noradrénaline a également une action sur la perméabilité osmotique à l'eau de la peau, par l'intermédiaire des récepteurs β (37). L'intéraction de la noradrénaline avec les récepteurs β reproduit donc les effets natriférique et hydrosmotique de l'ocytocine sur la peau.

Cependant, la noradrénaline est sans action sur le flux net d'eau à travers la vessie de grenouille (37). ORLOFF et al. (38) ont montré que l'effet le plus fréquent de la noradrénaline sur la vessie de crapaud est une inhibition des actions de la vasopressine par l'intermédiaire des récepteurs α. Toutefois, à certaines saisons et en présence d'inhibiteurs des récepteurs α, une certaine action stimulatrice de l'isoprotérénol (un analogue des catécholamines agissant plus particulièrement par l'intermédiaire des récepteurs β) est observée.

Il semble donc que la peau et la vessie possèdent les deux types de récepteurs aux catécholamines mais que les récepteurs β sont plus nombreux, ou ont une sensibilité plus grande dans l'épithélium de la peau.

Si les effets de l'ocytocine et les effets "β" de la noradrénaline sont de nature identique, il y a cependant de nombreuses différences dans les modalités d'action de ces deux hormones indiquant que les récepteurs sont parfaitement distincts.

Les réponses à l'ocytocine ne sont pas bloquées par les

inhibiteurs des récepteurs β ce qui indique qu'elle n'interagit pas avec ces récepteurs, et exclut en outre que l'ocytocine agisse en libérant localement de la noradrénaline. Les sensibilités à la noradrénaline sont différentes pour les éléments antérieurs et postérieurs de la peau, au contraire elles sont voisines pour l'ocytocine. Si on admet que les sites récepteurs de chaque hormone ont la même affinité sur toute la peau, l'amplitude de la réponse hormonale est une indication sur le nombre de sites par élément de peau. Cette observation indique donc qu'il n'y a pas de relation entre le nombre de sites récepteurs à l'ocytocine et le nombre de sites récepteurs à la noradrénaline.

Les différences dans les modalités d'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur le même élément de peau, en ce qui concerne l'effet maximum, la cinétique de réponse en fonction du temps et la relation entre la réponse et la concentration d'hormone, qui peuvent résulter aussi bien d'une différence dans les modalités de fixation des hormones sur leurs récepteurs que de différences dans les voies conduisant à l'effet natriférique final, pourront être discutées lorsque le rôle de l'AMP cyclique comme intermédiaire pour ces deux hormones aura été évalué.

L'AMP cyclique ajouté au milieu séreux reproduit l'action natriférique de l'ocytocine et de la noradrénaline ; cependant, la concentration nécessaire (10^{-3} M) est beaucoup plus grande (environ 1000 fois) que la concentration atteinte dans le milieu intracellulaire, même après stimulation par l'hormone (39). Toutefois, cette caractéristique a été retrouvée sur tous les tissus où l'AMP cyclique est impliqué comme médiateur d'une action hormonale (cf Rev. 30) l'explication la plus fréquente est que l'AMP cyclique pénètre mal dans les cellules. Cependant, sur la vessie, GULYASSY, en utilisant de l'AMP cyclique marqué, a montré que la radioactivité cellulaire s'équilibrait avec la radioactivité externe assez rapidement (40), on peut donc penser plutôt que la phosphodiestérase détruit la plupart

de l'AMP cyclique au fur et à mesure de son entrée dans la cellule, empêchant qu'une concentration suffisante pour déclencher l'effet soit atteinte au niveau de l'effecteur, sauf pour de fortes concentrations externes.

La théophylline seule produit également un effet natriférique. Cette action paraît bien dépendre de son action inhibitrice sur la phosphodiestérase, puisqu'elle amplifie la réponse de la peau à l'AMP cyclique exogène. Cet effet natriférique de la théophylline indique qu'il y a une certaine production endogène d'AMP cyclique et que celui-ci peut s'accumuler par suite de l'inhibition de la phosphodiestérase. La Théophylline amplifie les réponses à de faibles concentrations d'ocytocine et de noradrénaline. Si ces deux hormones agissaient comme la théophylline en inhibant la phosphodiestérase, ou par un mécanisme tout différent, leur effet ne pourrait que s'additionner avec celui de la théophylline.

L'action amplificatrice de la théophylline s'explique si l'ocytocine et la noradrénaline provoquent une augmentation de la concentration intracellulaire de l'AMP cyclique en stimulant sa production, puisque cette amplification est analogue à celle qu'elle produit quand la concentration intracellulaire de l'AMP cyclique est augmentée par l'entrée d'AMP cyclique exogène. Par ce moyen indirect la stimulation d'une activité adénylcyclasique par l'ocytocine et la noradrénaline est fortement suggérée. ORLOFF et HANDLER (27) sur la vessie de crapaud, BOURGUET (41) sur la vessie de grenouille, ont interprétés de façon similaire l'amplification par la théophylline des réponses à la vasopressine. En outre, HANDLER et al. ont vérifié que la vasopressine augmentait la concentration intracellulaire d'AMP cyclique en mesurant directement celle-ci (39).

Cependant, il reste possible d'interpréter l'action de la vasopressine sur la concentration intracellulaire de l'AMP cyclique comme une action indirecte tant qu'une stimulation directe par la vasopressine

d'une adénylcyclase isolée n'a pas été mise en évidence (par exemple si l'AMP cyclique et la vasopressine sont deux éléments d'une boucle régulatrice du transport actif de sodium, la vasopressine agissant directement et l'AMP cyclique étant impliqué dans l'accroissement du metabolisme énergique nécessaire au transport). Par contre, la stimulation directe d'une adényl cyclase par les catécholamines a pu être démontrée dans le foie, où elles ont une action glycogénolytique, ou dans le tissu adipeux où elles ont une activité lipolytique. Il est très vraisemblable que le mécanisme de leur action natriférique sur la peau soit le même. Comme l'action de la théophylline est identique en ce qui concerne l'ocytocine et la noradrénaline, il est logique d'admettre que l'AMP cyclique joue le rôle de médiateur intracellulaire pour ces deux hormones.

Nous avons trouvé qu'il n'y avait pas de relation entre le nombre de sites récepteurs à l'ocytocine et le nombre de sites récepteurs à la noradrénaline. Ceci indique que les sites récepteurs spécifiques pour chaque hormone doivent stimuler des adénylcyclases différentes. Cette hypothèse est confirmée par le fait qu'il est possible d'avoir un supplément d'effet avec la noradrénaline quand les récepteurs à l'ocytocine sont saturés par une forte concentration.

Puisque l'AMP cyclique reproduit les actions des deux hormones, les étapes séparant l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMP cyclique de l'effet natriférique final doivent être communes à l'ocytocine et à la noradrénaline ; on peut donc penser que les modalités cinétiques d'action différentes mises en évidence reflètent des modalités différentes de fixation des hormones sur leur récepteur spécifique : la réponse à la noradrénaline est plus rapide que la réponse à l'ocytocine ; dans ce dernier cas, au moins, la chaîne de réactions impliquées après la production d'AMP cyclique n'est pas le facteur limitant la cinétique de la réponse. Ceci indique que la vitesse de la réaction de l'ocytocine avec son récepteur pourrait

être assez lente.

La relation entre l'amplitude de la réponse et la concentration de noradrénaline est une relation hyperbolique, semblable à la relation de MICHAELIS et MENTEN concernant la vitesse d'une réaction enzymatique en fonction de la concentration de son substrat, où la vitesse de la réaction enzymatique est proportionnelle à la quantité de complexe enzyme-substrat formé ; ceci suggère que la réponse natriférique, malgré toutes les étapes interposées, reste proportionnelle à la quantité de complexe hormone-récepteur. La relation sigmoïde obtenue entre l'amplitude de la réponse natriférique et la concentration d'ocytocine paraît donc caractéristique des modalités de la fixation de l'ocytocine sur son récepteur (d'autant plus qu'une relation sigmoïde analogue est obtenue dans le cas de la réponse hydrosmotique sur la vessie (42). Par analogie avec l'hémoglobine et les enzymes allostériques pour lesquels des courbes sigmoïdes, donnant dans la représentation de HILL des droites de pente supérieure à 1, sont obtenues, ceci implique que la fixation de l'ocytocine sur un site n'est pas indépendante de l'état des sites voisins.

La plus grande partie des résultats présentés dans ce chapitre a déjà été publiée (37, 42)

CHAPITRE III

RECHERCHE D'UNE ACTION HORMONALE SUR LA PERMEABILITE POUR LE SODIUM DE LA FACE MUQUEUSE DES CELLULES EPITHELIALES

INTRODUCTION

A la suite des travaux de USSING et al. (2, 14,25) sur la peau de grenouille, et de LEAF (4) sur la vessie de crapaud, il est généralement admis que l'effet natriférique des hormones neurohypophysaires est dû à une augmentation de la perméabilité pour le sodium de la face muqueuse des cellules épithéliales. On a tout d'abord pensé qu'un mécanisme unique pouvait rendre compte à la fois de l'action hydrosmotique et natriférique des hormones. En ce qui concerne l'effet hydrosmotique, il est démontré que la face muqueuse est le facteur limitant le passage de l'eau. Une augmentation de sa perméabilité à l'eau par l'hormone rend compte de l'effet hydrosmotique (2, 5). Dans le cas de l'effet natriférique, rendre compte d'une augmentation du transport actif de sodium par une action sur une perméabilité passive apparait plus paradoxal ; toutefois, si l'activité de la pompe située à la face séreuse, qui transporte activement le sodium hors des cellules, est limitée par la quantité de sodium entrant par la face muqueuse, une augmentation de la perméabilité de cette face, permettant une entrée accrue de sodium, peut provoquer une augmentation de l'activité de la pompe, donc une augmentation du transport actif à travers toute la structure.

Malheureusement, ce modèle a du être compliqué pour rendre compte des observations expérimentales : BOURGUET et al. (6, 43) à l'aide d'analogues des hormones neurohypophysaires ont montré que l'effet hydrosmotique était indépendant de l'effet natriférique. De plus, FRAZIER et al. (16) ont montré que la radioactivité dans le tissu, après équilibration avec du 24 Na introduit dans le milieu muqueux, n'augmentait pas linéairement avec la concentration de sodium

dans le milieu muqueux mais selon une courbe hyperbolique et atteignait une valeur maximum pour une concentration de 30 à 60 mM de Na^+; de plus, la concentration maximum de sodium intracellulaire augmenterait en présence de vasopressine. Ceci indique que le passage du sodium à la face muqueuse implique une interaction avec des sites membranaires en nombre limité. Si l'hypothèse d'une entrée passive de sodium au niveau de la face muqueuse est conservée, il faut proposer pour l'action natriférique un mécanisme complètement distinct de celui de l'action hydrosmotique : une augmentation, soit du nombre de transporteurs accessibles au sodium externe, soit du "turn-over" des transporteurs à travers la membrane muqueuse.

Pour que l'entrée de sodium puisse se faire passivement, il faut qu'il existe au niveau de la face muqueuse un gradient de potentiel électrochimique favorisant la pénétration du sodium dans toutes les circonstances où une absorption active a été mise en évidence ; or, KROGH, en 1937 (22) a montré qu'un transport actif subsistait même quand la concentration externe était de 10^{-5} M de sodium. La différence de potentiel électrique mesurée à l'aide de microélectrodes intracellulaires ne peut rendre compte de l'entrée de sodium : dans la peau non court-circuitée, la première barrière de potentiel trouvée au moment de la pénétration de la face muqueuse s'oppose au passage du sodium. Dans la peau court-circuitée, une différence de potentiel favorisant l'entrée du sodium existe, mais elle est faible et ne dépend pas de la concentration de sodium externe (44). Il est donc nécessaire de démontrer en outre que la concentration de sodium dans les cellules est toujours inférieure à la concentration dans le milieu muqueux. La mesure de la concentration intracellulaire du sodium présente de grandes difficultés techniques. Il y a sous l'assise épithéliale une couche de tissu conjonctif dont l'épaisseur représente 80 à 90 % de l'épaisseur totale de la peau de grenouille ou de la vessie de crapaud. De plus, même dans les cellules épithéliales, le sodium peut être réparti en différents compartiments dont un seul

est impliqué dans le transport actif (45). La mesure de concentration de sodium dans le tissu ne peut donc fournir aucune indication. FRAZIER et al (16) ont mesuré la radioactivité contenue dans la vessie après équilibration de celle-ci avec du ^{24}Na ajouté seulement au milieu muqueux : dans cette condition en effet, seul le compartiment concerné par le transport actif doit être marqué. De plus, tout le sodium du compartiment séreux a été remplacé par de la choline, afin d'éviter un apport de sodium par la face séreuse qui aurait entrainé une baisse de la radioactivité spécifique du sodium intracellulaire. Leurs mesures indiquent que même pour une concentration de sodium dans le milieu muqueux de 0,4 mM, la concentration de sodium dans la vessie serait inférieure à la concentration dans le milieu muqueux. Cependant, la concentration qu'ils mesurent ne reflète la concentration au niveau de l'épithélium que si le sodium est à la même concentration dans l'épithélium et le conjonctif. Si le sodium diffuse rapidement hors du conjonctif, sa concentration n'est plus homogène dans l'épaisseur du tissu, et la concentration dans les cellules épithéliales est sous-estimée.
Une entrée passive du sodium sur la face muqueuse n'est donc pas formellement établie.

Les expériences rapportées dans ce chapitre présentent une étude de ce problème selon un abord différent. Pendant la publication de ce travail effectué pendant les années 64-65, il est apparu que des expériences analogues étaient en cours dans le laboratoire de LEAF. Les résultats qu'il a obtenu seront présentés dans la discussion. Notre hypothèse de travail a été la suivante :
Si la concentration de sodium est suffisamment faible dans le milieu muqueux, et si la concentration de sodium dans le milieu séreux est maintenue à 112 mM, l'entrée de sodium par la face séreuse (bien que sa perméabilité au sodium soit faible) doit dépasser l'entrée de sodium par la face muqueuse. Dans cette condition, le flux sortant est supérieur au flux entrant et le flux net de sodium est donc

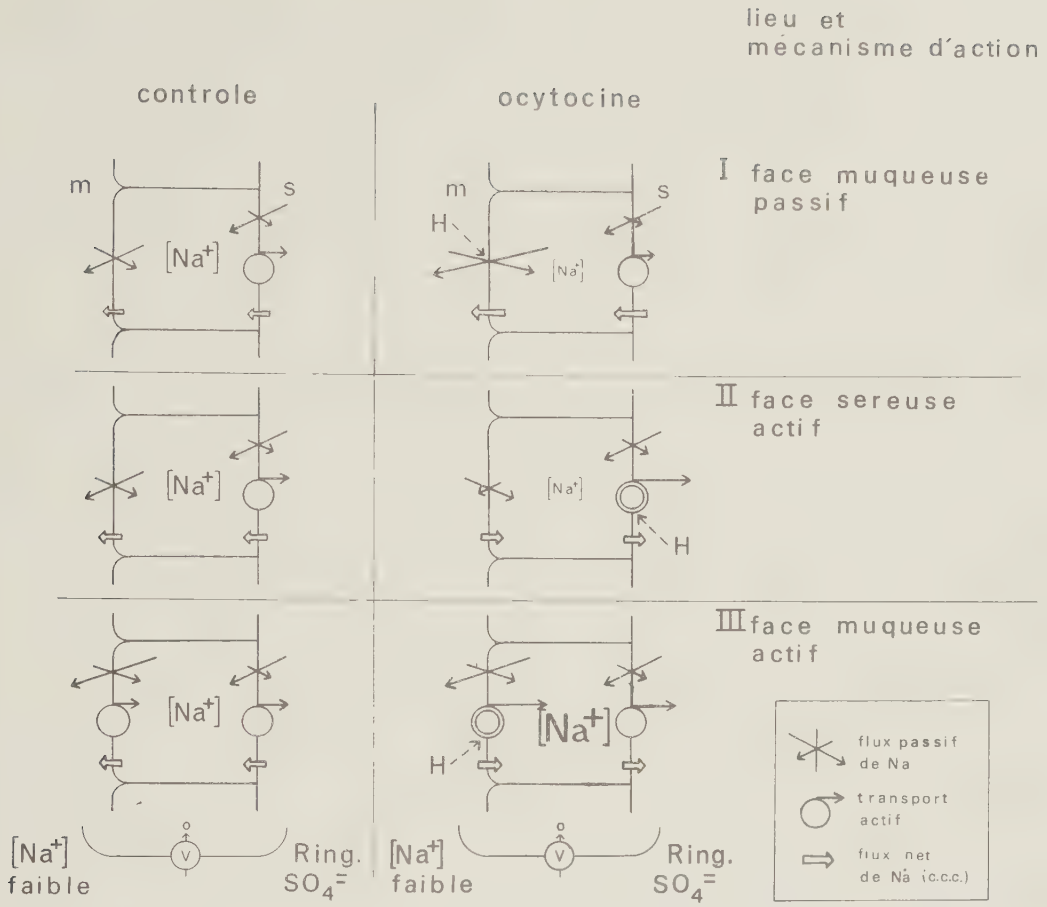


Fig. 15: Schéma illustrant trois hypothèses concernant l'action de l'ocytocine (H) sur le flux net de sodium quand la concentration du sodium dans le milieu muqueux est assez basse pour que le flux net soit initialement dirigé du milieu séreux (s) vers le milieu muqueux (m).

négatif (dirigé de la face séreuse vers la face muqueuse). En outre, la concentration intracellulaire est forcément supérieure à la concentration de sodium dans le milieu muqueux. Il est alors possible de prévoir que l'hormone aura une action différente sur les flux de sodium selon qu'elle augmente la perméabilité passive de la face muqueuse, ou stimule un mécanisme de transport actif. Les conséquences de 3 hypothèses sont illustrées sur le schéma de la figure 15.

Si l'hormone agit sur la perméabilité passive de la face muqueuse, les flux entrant et sortant seront augmentés, le flux net de sodium, sortant au niveau de cette face, sera donc augmenté. On devait donc observer une augmentation du flux net de sodium négatif à travers toute la peau, car l'augmentation du flux unidirectionnel sortant de sodium doit être supérieur à l'augmentation éventuelle du flux unidirectionnel entrant.

Si la pénétration au niveau de la face muqueuse est passive mais que l'hormone stimule la "pompe" séreuse, la sortie de sodium vers le milieu séreux sera accrue, la concentration intracellulaire diminuée, et donc la diffusion du sodium vers le milieu muqueux, tandis que la diffusion du milieu muqueux vers la cellule pourra être accrue. On aura donc une diminution du flux net de sodium négatif ou même une inversion du sens du flux net de sodium, résultant à la fois d'une augmentation du flux unidirectionnel entrant et d'une diminution du flux unidirectionnel sortant.

Si on postule un mécanisme de transport actif à la face muqueuse stimulé par l'hormone, le flux de sodium entrant à travers cette face sera augmenté. Il y aura donc plus de sodium disponible pour la pompe séreuse et le flux unidirectionnel entrant à travers toute la peau sera augmenté, sans modification associée du flux unidirectionnel sortant. Le résultat est que l'amplitude du flux net négatif doit diminuer, éventuellement le flux net peut redevenir positif.

Si, dans la condition expérimentale où la concentration de sodium est abaissée dans le milieu muqueux, on désire que le courant de court-circuit mesure encore le flux net de sodium, il faudrait remplacer le chlorure par un anion imperméant, sinon le gradient de chlorure à travers la peau entrainerait un flux net sortant de chlorure, donc un courant venant en déduction de celui correspondant au flux net sortant de sodium. Pour minimiser le plus possible le flux net d'anion, nous avons remplacé tout le chlorure par du sulfate auquel la peau est peu perméable (26) de façon à ce que le courant de court-circuit diffère peu du flux net de sodium.

Dans une condition de courant de court-circuit négatif indiquant un flux net de sodium sortant, nous avons recherché comment les flux unidirectionnels de sodium et de sulfate étaient modifiés par l'addition à la préparation d'une concentration d'ocytocine donnant une réponse maximale dans les conditions habituelles.

Nous avons ensuite recherché de quelle manière les flux unidirectionnels dépendaient de la concentration de sodium externe, et comment cette dépendance était modifiée par l'ocytocine, pour un domaine de concentrations de sodium encadrant la concentration critique pour laquelle le flux net de sodium change de sens.

De plus, dans quelques expériences, nous avons étudié l'action de l'hormone sur le courant de court-circuit pour des concentrations de sodium extrêmement basses, puis dans un domaine de concentration très large s'étendant jusqu'aux concentrations de sodium dans le Ringer.

MATERIEL ET METHODES

Animaux : les expériences ont été faites sur la peau ventrale isolée de grenouille Rana esculenta conservées à jeun dans l'eau courante à environ 18°.

Méthodes de mesure : la mesure du courant de court-circuit et des flux unidirectionnels ont été faits avec l'appareil à 6 voies, de la

même manière que pour les expériences décrites dans le Chapitre II sauf que des électrodes à sulfate d'argent ont été montées à la place des électrodes à chlorure d'argent précédemment utilisées pour le passage du courant de court-circuit. Les flux unidirectionnels ont été mesurés à l'aide des isotopes ^{24}Na et ^{35}S sous forme de $^{24}Na_2\ SO_4$ et $^{35}SO_4Na_2$. Les comptages ont été faits de la même façon que pour le ^{36}Cl. Les concentrations de sodium dans le milieu muqueux ont été mesurées au photomètre de flamme.

La concentration de sulfate a été calculée d'après la concentration du sodium, connaissant la composition du Ringer utilisé.

Produits employés

Le Ringer utilisé du coté séreux avait la composition suivante : Na^+ : 112 mM ; K^+ : 3,2 mM ; Ca^{++} : 1 mM ; Mg^{++} : 1 mM ; $PO_4H_2^-$: 1,2mM ; CO_3H^- : 2 mM ; $SO_4^=$ 58 mM.

Comme milieu muqueux, un Ringer de composition identique ne contenant pas de sodium ($SO_4^=$: 2 mM) a été mélangé au Ringer prédédant en proportions variables.

L'ocytocine est de l'ocytocine de synthèse Syntocinon (Sandoz).

RESULTATS

A. ACTION DE L'OCYTOCINE EN COURANT DE COURT-CIRCUIT NEGATIF

La peau est montée avec, du côté muqueux, une concentration de sodium suffisamment basse pour que le courant de court-circuit se stabilise à une valeur négative.

La figure 16 montre deux exemples de réponses hormonales sur le courant de court-circuit et le flux entrant de sodium. L'ocytocine à une concentration donnant une réponse maximale ($2,2.10^{-8}$M) a été ajoutée à un élément de peau, l'élément symétrique servant de témoin.

Le courant de court-circuit, négatif avant l'addition de

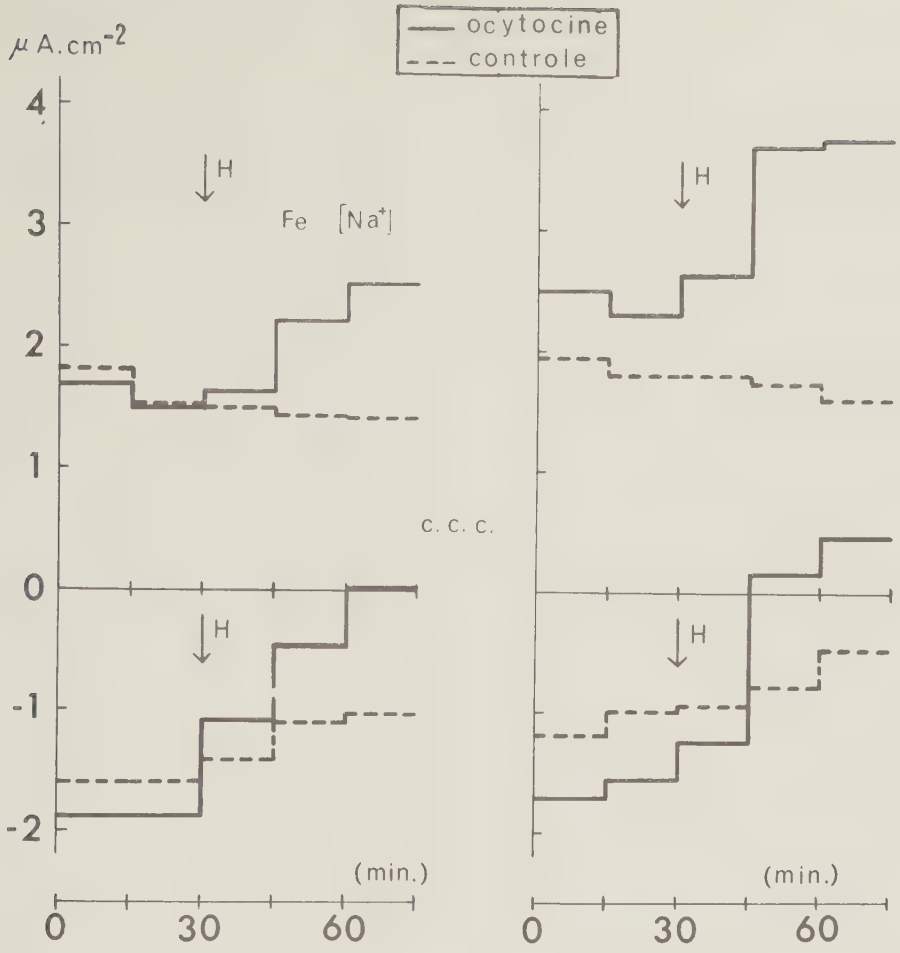


Fig. 16: Deux exemples de l'action de l'ocytocine sur le flux entrant de sodium quand le courant de court-circuit est négatif.

Evolution en fonction du temps du flux entrant de sodium ($Fe\ Na^+$) et du courant de court-circuit moyen (C.C.C.), mesurés pendant des périodes de 15 minutes. L'ocytocine ($2{,}2\ 10^{-8}M$) a été ajoutée à un élément de peau au moment indiqué par la flèche (h). L'élément symétrique sert de contrôle. La concentration de sodium dans le milieu muqueux était de 0,29 mM dans l'expérience reproduite sur la partie gauche de la figure, et de 0,27 mM dans l'expérience reproduite sur la partie droite.

TABLEAU VI

Comparaison de l'évolution du courant de court-circuit (C.C.C.) et du flux entrant de sodium (Fe. Na^+) en l'absence ou en présence d'ocytocine. Moyennes de 9 déterminations (μ A/0,8 cm^2)

	Contrôle		Ocytocine période 4	
	C.C.C.	$Fe.Na^+$	C.C.C.	$FeNa^+$
2	- 0,99	2.21	- 1.19	2.34
4	- 0.66	2.12	0.03	3.06
Δ(4-2)	0.37 ± 0.04	-0.10 ± 0.06	1.16 ± 0.10	0.73 ± 0.12
Δ(4-2)	ocytocine - contrôle		0.79	0.83

l'hormone, ou sur la voie témoin, devient moins négatif sous l'effet de l'hormone et peut même devenir positif. La mesure simultanée du flux entrant montre que celui-ci augmente également sous l'action de l'hormone. Le tableau VI donne les moyennes du courant de court-circuit et du flux entrant de sodium pendant la période 2 et la période 4 pour une série d'expériences identiques. Le courant de court-circuit augmente sur l'élément témoin pendant la durée de l'expérience, alors que le flux entrant diminue un peu. Si on soustrait de l'augmentation de courant de court-circuit et de flux entrant obtenue sous l'action de l'ocytocine les variations correspondantes sur la voie témoin, l'augmentation du flux entrant est identique à l'augmentation du courant de court-circuit.

Dans une partie de ces expériences, le flux entrant de sulfate a été également mesuré. Ce flux n'évolue pas significativement en fonction du temps.

Une autre série d'expériences a été faite dans des conditions un peu différentes pour la mesure des flux sortants : comme la face séreuse est située du côté de la chambre commune, c'est dans celle-ci que l'hormone est ajoutée ; il ne peut donc y avoir de voies témoins

permettant de connaître l'évolution spontanée des flux et du courant en fonction du temps ; aussi les périodes de flux ont été réduites à 1/4 d'heure pour minimiser cette évolution.

La différence entre l'amplitude du courant de court-circuit pendant la période 4 (effet de l'hormone) et la période 2 (témoin) ainsi que les différences correspondantes pour les flux unidirectionnels de sodium et de sulfate, sont portées sur le tableau VII de façon à mettre en évidence leur variation sous l'effet de l'hormone. (Les différences figurant dans le tableau VI concernant le flux entrant de sodium ont été reprises pour faciliter la comparaison). Ni le flux entrant de sulfate, ni les flux sortants de sodium et de sulfate ne sont affectés significativement par la présence d'hormone.

Le tableau VIII indique les moyennes des valeurs absolues du courant de court-circuit et des flux unidirectionnels avant l'addition d'hormone (période 2). Comme les moyennes des courants de court-circuits sont très voisines pour les diverses expériences, on peut penser que les divers flux unidirectionnels étaient peu différents, et calculer approximativement les flux nets de sodium et de sulfate d'après la moyenne des flux sortants et entrants. Pour l'ensemble des expériences, la concentration de sodium moyenne est de 0,8 mM, le flux net de sodium est bien sortant, le flux net de sulfate est sortant également et représente environ 50 % du flux net de sodium. La figure 17 résume les résultats obtenus en présentant les moyennes des flux unidirectionnels avant et après action de l'ocytocine.

Au cours de quelques expériences, nous avons vérifié que les résultats n'étaient pas modifié quand le milieu muqueux était rendu isotonique au milieu séreux par addition de mannitol.

TABLEAU VII

EFFET DE L'OCYTOCINE SUR LES FLUX UNIDIRECTIONNELS DE SODIUM ET DE SULFATE QUAND LE COURANT DE COURT CIRCUIT EST NEGATIF (CONCENTRATION DE SODIUM 0,8 mM EN MOYENNE)

La valeur du flux unidirectionnel pendant la période témoin (période 2) a été soustraite de la valeur du flux pendant la période suivant le développement de l'action de l'ocytocine (période 4); la différence est exprimée en $\mu A/ 0,8 cm^2$.

Le tableau donne la moyenne des différences ($\bar{\Delta}$), ainsi que l'erreur type sur la moyenne; le seuil de probabilité (P) pour que cette différence soit significativement différente de 0 est indiqué ainsi que le nombre de mesures (entre parenthèses). La moyenne des augmentations de courant de court-circuit pendant les mêmes expériences est présentée dans la partie droite du tableau.

	Flux unidirectionnel			Courant de court-circuit		
	$\bar{\Delta}$	err.type	P	$\bar{\Delta}$	err.type	P
Fe Na^+ (9)	0,728	± 0,118	P < 0,001	1,158	± 0,102	P < 0,001
Fs Na^+ (24)	0,014	± 0,087	P > 0,5	1,548	± 0,281	P < 0,001
Fe $SO_4^=$ (5)	0,068	± 0,103	P > 0,5	1,140	± 0,173	P < 0,005
Fs $SO_4^=$ (23)	- 0,022	± 0,044	P > 0,5	1,516	0.335	P < 0.001

TABLEAU VIII

COMPARAISON DU COURANT DE COURT-CIRCUIT ET DES FLUX UNIDIRECTIONNELS DE SODIUM ET DE SULFATE AVANT L'ADDITION D'OCYTOCINE

La concentration de sodium dans le milieu muqueux est en moyenne de 0,8 mM. La moyenne des flux entrants de sodium ($FeNa^+$) et de sulfate ($FeNa^+$) ainsi que la moyenne des flux sortants de sodium ($FsNa^+$) et de sulfate ($FsSO_4^=$) ont été portée en regard de la moyenne du courant de court-circuit (C.C.C.) mesuré pendant les mêmes périodes (le nombre de mesures est indiqué entre parenthèses). Les valeurs de C.C.C. des différentes expériences étant comparables, les flux nets de sodium ($Fn\ Na^+$) et de sulfate ($Fn\ SO_4^=$) ont été évalués par la différence entre le flux entrant moyen et le flux sortant moyen. Le signe négatif indique que le flux net est dirigé du milieu séreux vers le milieu muqueux. Les moyennes sont exprimées en µ A/0,8 cm2

$Fe\ Na^+$	$Fs\ Na^+$	$Fe\ SO_4^=$	$Fs\ SO_4^=$	C.C.C.
2.34 ± 0.37 (9)				- 1,19 ± 0,26
	3.64 · 0.42 (24)			- 1,45 ± 0,27
		0.34 ± 0.12 (5)		- 1,25 ± 0,45
			0.96 ± 0.20 (23)	- 1,29 ± 0,29

$Fn\ Na^+$	$Fn\ SO_4^=$	C.C.C. (moyenne)
- 1,31	- 0,62	- 1,26 (37)

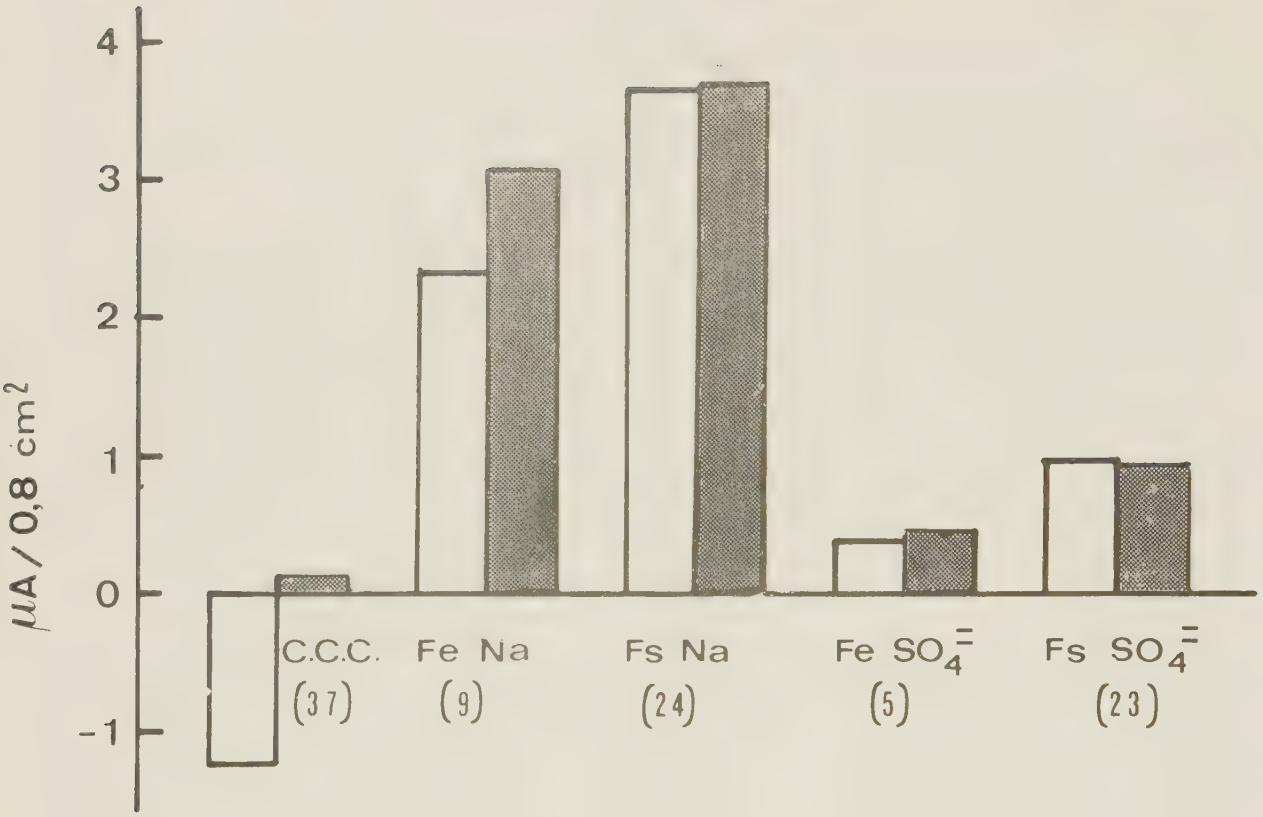


Fig. 17: Récapitulation des effets de l'ocytocine sur les flux unidirectionnels de sodium et de sulfate en courant de court-circuit négatif.

En blanc: valeurs moyennes du courant de court-circuit (C.C.C.), des flux entrants (Fe) et des flux sortants (Fs) pendant la période témoin précédant l'addition d'ocytocine (2° période, cf Fig. 16)
En gris:valeurs moyennes du C.C.C. et des flux unidirectionnels après stimulation par l'ocytocine (4° période)
Le nombre de mesures est indiqué entre parenthèses. Les expériences sont réparties comme suit: 9 expériences dans les conditions de mesure de flux entrants, dont 5 où Fe Na^+ a été mesuré, et 4 où Fe Na^+ et Fs $SO_4^=$ ont été mesurés simultanément. 28 expériences dans les conditions de mesure de flux sortants, 6 où Fs Na^+ a été mesuré, 5 où Fs $SO_4^=$ a été mesuré et 18 où les 2 Fs ont été mesurés simultanément.
La concentration moyenne de sodium dans ces expériences était de 0,8mM.

B. ACTION HORMONALE EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DU SODIUM EXTERNE

Pour confirmer les expériences précédentes, il nous a paru nécessaire de vérifier que l'action de l'hormone était identique pour un domaine de concentration de sodium externe assez large incluant à coup sûr la concentration critique pour laquelle le flux net de sodium change de sens, que nous ne pouvons pas déterminer individuellement pour chaque élément dans nos expériences.

Nous avons fait varier les concentrations de sodium externe de 0,1 à 4 mM, et mesuré l'évolution du courant de court-circuit et des flux unidirectionnels de sodium et de sulfate, en présence et en absence d'hormone. Quand la concentration de sodium est changée brusquement, le courant de court-circuit se stabilise à sa nouvelle valeur d'équilibre, en 2 à 3 minutes ; l'ajustement du flux entrant de sodium paraît aussi très rapide : il n'y a pas de différence entre le flux mesuré dans la période suivant immédiatement le changement de concentration, et la période suivante.

Sur la figure 18 sont portés les résultats de 2 expériences où le courant de court-circuit et le flux entrant de sodium sont mesurés en fonction de la concentration de sodium.

L'évolution du courant de court-circuit décrit avec une bonne approximation une droite quand la concentration de sodium est portée sur une échelle logarithmique. Le flux entrant de sodium croit linéairement, selon une droite parallèle à celle représentant le courant de court-circuit, en présence ou en absence d'hormone. Ceci indique que seul le flux entrant de sodium est modifié par la variation de la concentration de sodium. Pour préciser cette indication, nous avons recherché la corrélation entre l'augmentation du flux entrant de sodium et l'augmentation du courant de court-circuit, pour les éléments témoins et les éléments symétriques traités à l'ocytocine. La figure 19 montre cette corrélation dans le cas d'éléments témoins.

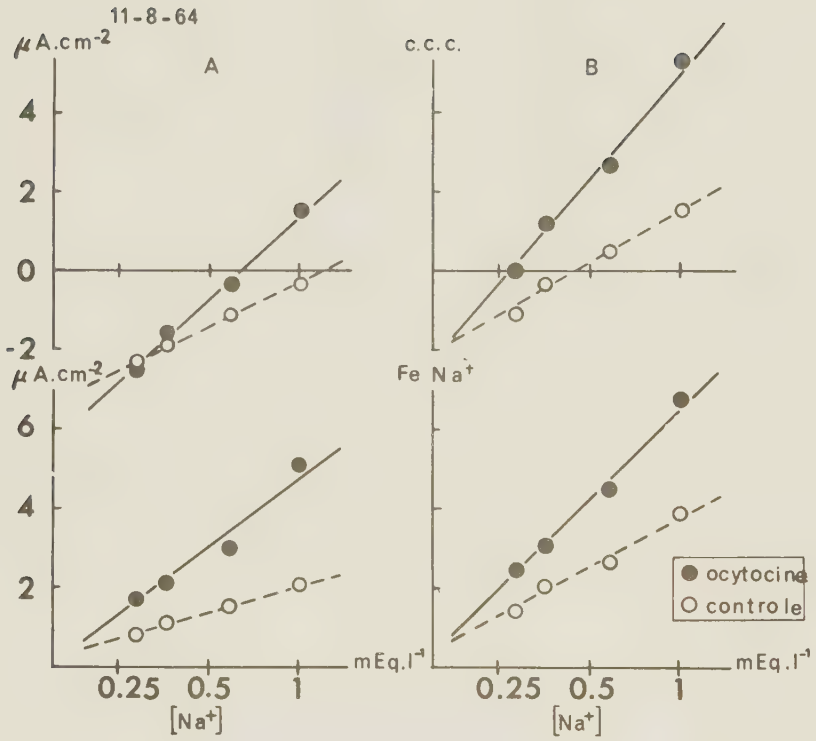


Fig. 18: Deux exemples de l'action de l'ocytocine en fonction de la concentration de sodium dans le milieu muqueux.

En abscisses, le courant de court-circuit (C.C.C.) et le flux entrant de sodium (Fe Na^+), mesurés pendant des périodes de 15 minutes, pour un élément de peau ayant reçu de l'ocytocine ($2{,}2\ 10^{-8}$M) et un élément servant de contrôle. En ordonnées, la concentration de sodium dans le milieu muqueux, portée sur une échelle logarithmique.

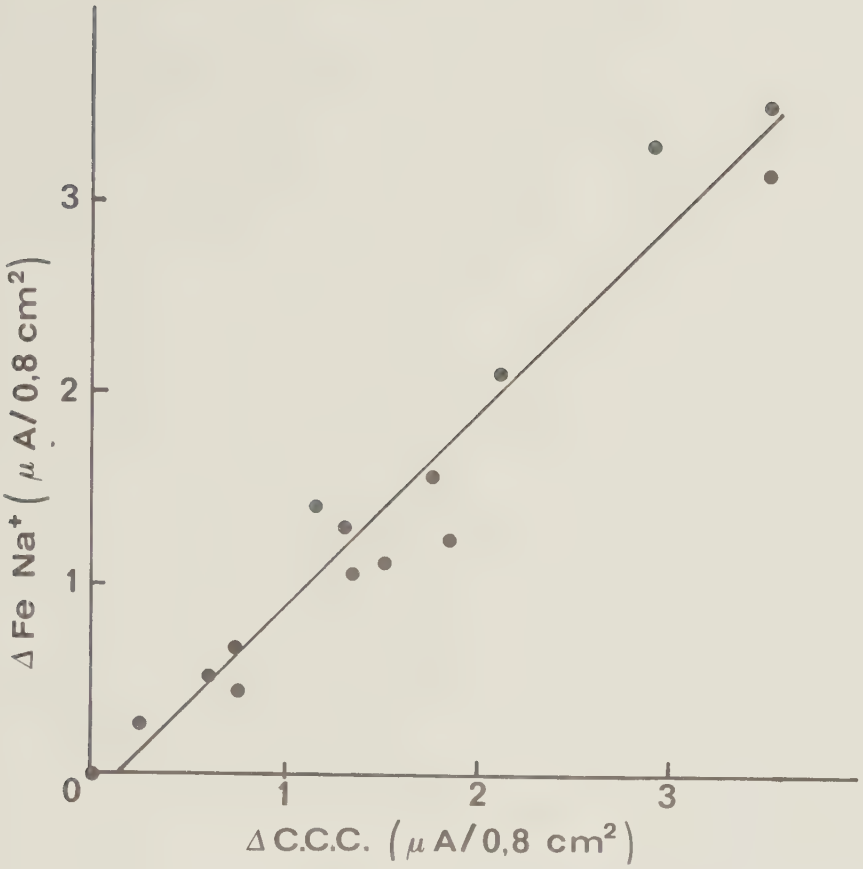


Fig. 19: Relation entre la variation du flux entrant de sodium et l'augmentation du courant de court-circuit quand la concentration externe de so sodium passe de 0,1 à 4 mM, en l'absence d'ocytocine.

La valeur du flux unidirectionnel correspondant à la concentration de sodium la plus faible a été soustraite de la valeur du flux unidirectionnel mesuré sue le même élément en présence de différentes concentrations de sodium externe plus élevées. Les différences ($\Delta Fe\ Na^+$) pour 6 éléments différents ont été portées en fonction de l'augmentation de courant de court-circuit ($\Delta C.C.C.$) correspondante. La pente de la droite de régression linéaire ($a = 1,019$) a été déterminée par la méthode des moindres carrés.

La pente de la droite de régression linéaire, calculée à partir des points expérimentaux, n'est pas significativement différente de 1 (cf Tableau IX). Nous avons également recherché cette corrélation dans le cas du flux entrant de sulfate, ainsi que dans le cas des flux sortants de sodium et de sulfate dans des expériences un peu différentes : un élément de peau, dans la première partie de l'expérience, est soumis à diverses concentrations de sodium dans un ordre aléatoire, et sert de témoin pour la deuxième partie de l'expérience, où il est soumis aux mêmes concentrations de sodium après développement de la réponse hormonale. Le tableau IX résume les résultats obtenus ; il donne, en absence et en présence d'hormone, les pentes des droites de régression linéaire ainsi que les coefficients de corrélation correspondant à la variation des divers flux unidirectionnels en fonction de l'augmentation du courant de court-circuit(cf fig.

En ce qui concerne le flux entrant de sulfate et les flux sortants de sodium et de sulfate, les pentes ne sont pas significativement différents de 0 ; au contraire, en ce qui concerne le flux entrant de sodium, la pente n'est pas significativement différente de 1.

Sous l'action de l'hormone, la croissance du courant de court-circuit et du flux entrant est plus rapide en fonction de l'augmentation de sodium que sur la voie témoin ; ceci indique que la réponse à l'hormone - une augmentation de flux entrant entrainant une augmentation du courant de court-circuit - est dépendante de la concentration de sodium. Si on extrapole vers les basses concentrations de sodium les droites représentant le courant de court-circuit pour l'élément traité à l'hormone et l'élément témoin, ces droites sont concourantes ; on peut donc prévoir qu'il y a une concentration de sodium pour laquelle la réponse ne se produit plus. Nous avons recherché expérimentalement cette limite ; la fig. 20 présente une telle expérience faite sur 2 éléments symétriques ayant exactement

TABLEAU IX

RELATION ENTRE LA VARIATION DES FLUX UNIDIRECTIONNELS DE SODIUM ET DE SULFATE ET L'AUGMENTATION DE COURANT DE COURT-CIRCUIT DUE A L'AUGMENTATION DE LA CONCENTRATION DE SODIUM DANS LE MILIEU EXTERNE

La valeur du flux unidirectionnel correspondant à la concentration de sodium la plus faible a été soustrait de la valeur du flux unidirectionnel mesuré en présence de différentes concentrations de sodium plus élevées. La relation entre la variation du flux unidirectionnel et l'augmentation de courant de court-circuit correspondante a été évaluée en mesurant le coefficient de corrélation (r) et la pente de la droite de régression linéaire (a). Le seuil de probabilité (P) pour que le coefficient de corrélation soit nul et que la pente soit différente de 1 dans le cas du flux entrant de sodium ($Fe\ Na^+$) ou de 0 dans le cas du flux entrant de sulfate ($Fe\ SO_4^=$) et des flux sortants de sodium ($Fs\ Na^+$) ou de sulfate ($Fs\ SO_4^=$) a été indiqué entre parenthèses ainsi que le nombre de mesures.

	Contrôle		Ocytocine	
	r	a	r	a
$Fe\ Na^+$	0,969 (14) P <0,001	1,019 P >0,5	0,978 (15) P < 0,001	1,115 0,1 < P < 0,2
$Fe\ SO_4^=$	0,250 (9) P >0,1	0,085 P >0,5	- 0,469 (9) P > 0,1	- 0,071 0,1 < P < 0,2
$Fs\ Na^+$	- 0,206 (21) P >0,1	- 0,067 0,2< P< 0,4	0,546 (17) 0,02< P< 0,05	0,050 0,010< P < 0,025
$Fs\ SO_4^=$	- 0,353 (21) P >0,1	- 0,053 0,1< P< 0,2	- 0,328 (17) P > 0,1	- 0,015 0,1 < P < 0,2

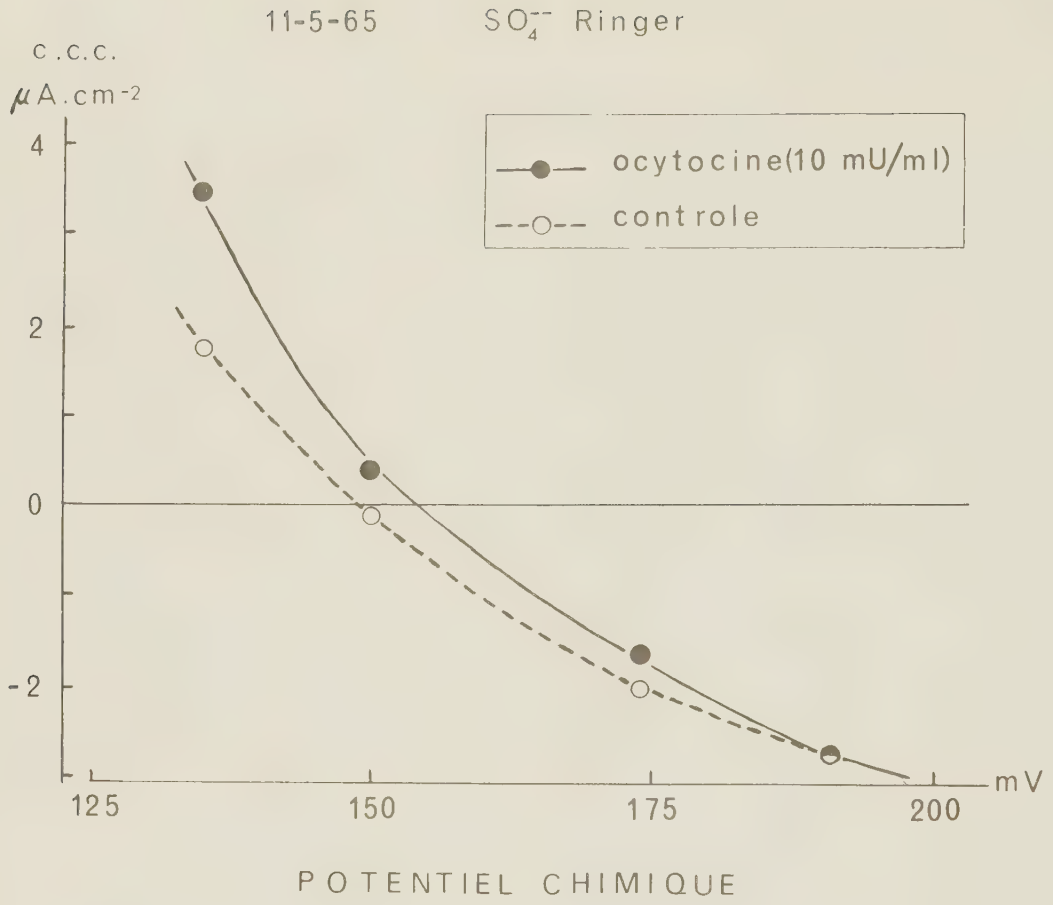


Fig. 20: Disparition de la réponse hormonale quand la concentration de sodium dans le milieu muqueux est abaissée.

En ordonnées, le courant de court-circuit (C.C.C.). En abscisses, le potentiel de diffusion pour le sodium (potentiel chimique) calculé en fonction de la différence de concentration de sodium entre le milieu séreux et le milieu muqueux.

le même courant de court-circuit en absence d'hormone et la même réponse à l'hormone, ce qui indique des flux unidirectionnels égaux. Un élément a été traité à l'ocytocine, l'autre servant de témoin ; puis la concentration de sodium muqueux a été abaissée jusqu'à disparition de la réponse hormonale. Le courant de court-circuit a été porté en fonction du potentiel de diffusion pour le sodium, résultant de la différence de concentration entre les milieux muqueux et séreux : $V = 58 \log Na_S/Na_m$ (potentiel chimique); la réponse hormonale disparait pour une concentration de 0,05 mM ce qui équivaut à une force électromotrice de 190 mV environ pour le système de transport.

Nous avons également étudié la réponse de l'hormone sur le courant de court-circuit pour des concentrations plus élevées : la figure 21 présente une expérience où le courant de court-circuit, pour un élément traité à l'hormone et un élément témoin, est mesuré pour des concentrations muqueuses allant jusqu'à 112 mM de sodium, concentration de sodium dans le Ringer utilisé sur la face séreuse.

Le courant de court-circuit de l'élément témoin cesse d'être dépendant de la concentration externe de sodium quand celle-ci atteint environ 50 mM; le mécanisme de transport de sodium parait saturé à partir de cette concentration. Si on fait l'analogie entre l'évolution du courant de court-circuit en fonction de la concentration du sodium et l'évolution de la vitesse de réaction d'un enzyme en fonction de la concentration de son substrat, ce phénomène de saturation est analogue à la vitesse maximum d'un enzyme. L'action de l'hormone peut être décrite comme une augmentation de la vitesse maximum.

Dans la figure 22 les points expérimentaux de la figure 21 ont été exprimés en % du maximum de la réponse, avec et sans hormone, il apparait que l'hormone ne modifie pas seulement la vitesse maximum mais aussi augmente l'affinité apparente pour le sodium : la demi-réponse maximale (km) est obtenue en présence d'hormone pour une concentration de sodium externe plus faible.

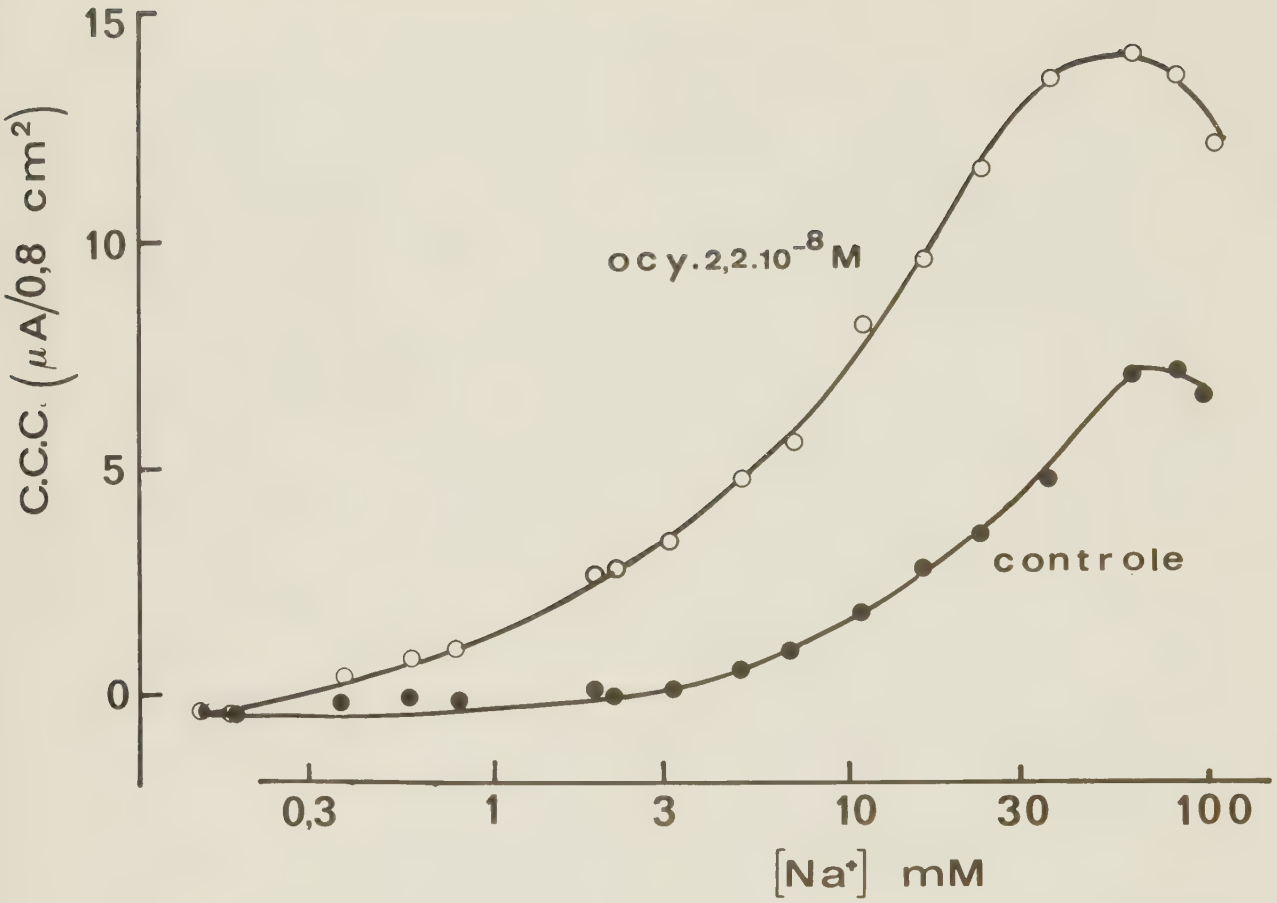
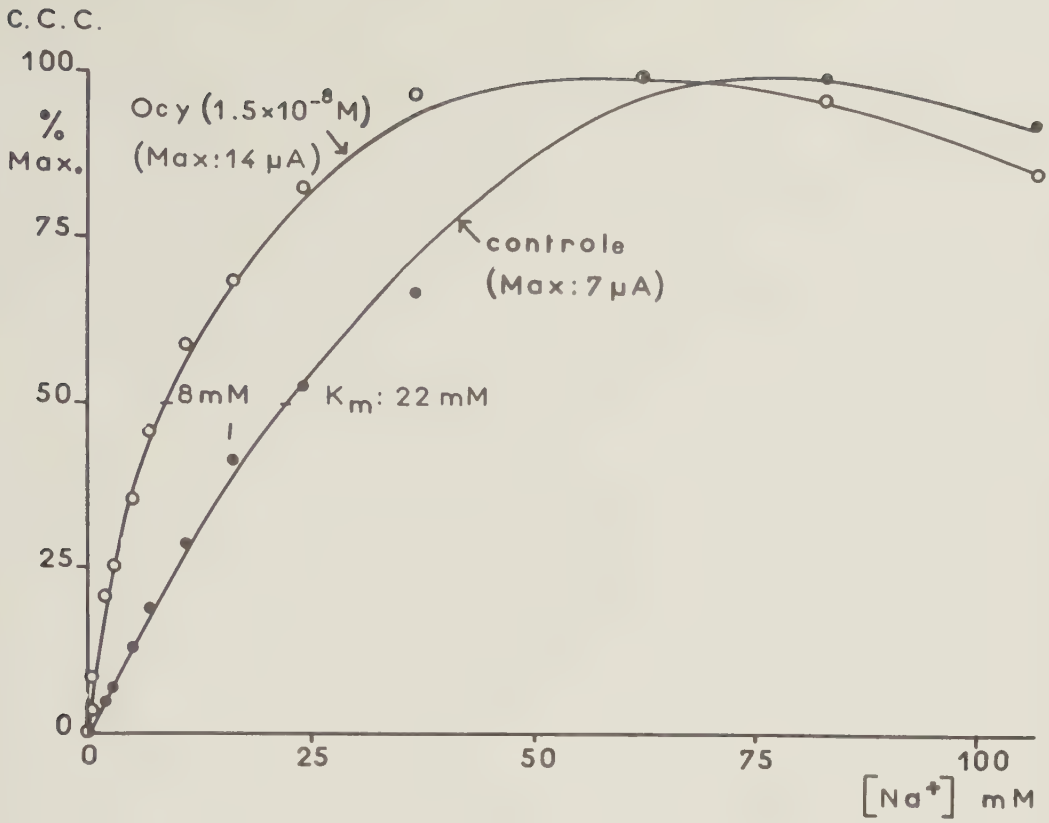


Fig. 21: Evolution du courant de court-circuit en fonction de la concentration de sodium dans le milieu externe pour un élément témoin et un élément symétrique traité à l'ocytocine.

En ordonées: le courant de court-circuit (C.C.C.) en μA/ 0,8 cm^2)
En abscisses: la concentration de sodium dans le milieu externe portée sur une échelle logarithmique.



Fig, 22: Action de l'ocytocine sur le Km apparent du sodium

En ordonnées, le courant de court-circuit (C.C.C.) en % du courant de court-circuit maximum. En abscisses, la concentration de sodium dans le milieu muqueux. Le Km apparent du sodium désigne la concentration de sodium pour la quelle le courant de court-circuit atteint 50 % de sa valeur maximale. (Même expérience que sur la figure 21)

DISCUSSION

Pour 48 éléments de peau appartenant à 8 peaux différentes, des concentrations de sodium, variables d'une expérience à l'autre, mais du même ordre de grandeur (0,8 mM en moyenne) ont produit, en l'absence d'hormone, des courants de court-circuit négatifs peu différents également (cf tableau VIII). Grâce à cette similitude de comportement, il parait légitime d'admettre que les flux unidirectionnels sortants et entrants, bien que mesurés indépendamment sur des peaux différentes, sont représentatifs pour l'ensemble des expériences. La moyenne des flux sortants de sodium est supérieure à la moyenne des flux entrants, ce qui indique que le flux net de sodium est bien négatif (dirigé de la face séreuse vers la face muqueuse). L'addition d'ocytocine produit une diminution du courant de court-circuit négatif. Dans certains cas, le courant de court-circuit change de sens et devient positif. L'analyse des variations des flux unidirectionnels sous l'action de l'ocytocine montre que l'hormone ne modifie significativement que le flux entrant de sodium; l'amplitude de son augmentation rend compte de l'augmentation du courant de court-circuit.

Les expériences où la concentration de sodium externe a été changée par étapes entre 0,1 et 4 mM, incluant la concentration pour laquelle le flux net change de sens, qui ne peut être déterminée expérimentalement, montrent que l'action de l'hormone sur le flux entrant seul se retrouve dans tout ce domaine de concentration; un facteur favorable permet de le mettre en évidence: seul le flux entrant de sodium augmente avec la concentration de sodium externe, aussi, l'augmentation du courant de court-circuit n'est-elle due qu'à l'augmentation de flux entrant de sodium. Nous avons pu le mettre en évidence en montrant que le coefficient de corrélation et la pente de la droite de régression linéaire entre la variation du flux unidirectionnel et la variation du courant de court-circuit correspondante, pour des concentrations de sodium croissantes dans le milieu externe, ne sont pas significativement différents de 1. Par contre, le coéfficient de corrélation et la pente de la droite de régression linéaire ne sont pas

significativement différents de 0 en ce qui concerne le flux sortant de sodium. Ceci indique que le flux sortant de sodium ne diminue pas avec la concentration externe de sodium dans ce domaine, bien qu'il soit 2 à 3 fois plus faible que quand la concentration externe est de 112 mM. Une diminution du flux sortant de sodium en fonction de la diminution de la concentration de sodium externe a été décrite par KIRSCHNER (46) pour des concentrations plus élevées. Les flux de sulfate ne varient pas non plus significativement; ceci peut s'expliquer par le fait que le Ringer sans sodium contient 2 mM de sulfate, aussi la variation de concentration du sodium, d'un facteur 40 dans le domaine étudié, entraine un changement de concentration de sulfate d'un facteur 2 seulement. La variation de flux unidirectionnel correspondante a pu être trop faible pour être décelée. La présence de l'ocytocine ne modifie aucune des corrélation entre les flux unidirectionnels et le courant de court-circuit, ce qui indique qu'en présence comme en absence d'hormone, seul le flux entrant est sensible à la variation de la concentration de sodium dans le milieu externe. Il est alors possible de déterminer comment l'amplitude de la réponse hormonale varie en fonction de la concentration de sodium externe, en comparant l'évolution du flux entrant de sodium (ou du courant de court-circuit) sur un élément témoin et un élément traité à l'ocytocine. On peut rendre linéaire l'augmentation du flux entrant pour ce domaine de concentration de sodium en la portant en fonction du logarithme de la concentration de sodium. En présence d'ocytocine, la relation linéaire est conservée, mais sa pente est plus grande. De plus, pour le domaine de concentration de sodium étudié (0,1 à 4 mM) le flux entrant (ou le courant de court-circuit) est plus élevé pour l'élément traité à l'ocytocine que pour l'élément témoin, ceci indique que l'ocytocine augmente le flux entrant de sodium dans tout de domaine de concentration. Cependant, l'amplitude de la réponse dépend de la concentration de sodium externe : elle est d'autant plus faible que la concentration de sodium est plus petite. Une étudie de la variation du courant de court-circuit pour des concentrations de sodium plus basses encore montre que l'action de l'hormone disparait pour une

concentration de sodium de 0,05 mM.

Au-dessus de cette concentration de sodium, l'effet de l'hormone est donc toujours de même nature. Quelque soit le sens du flux net de sodium, l'hormone augmente le flux entrant de sodium; cette action est identique à celle qui a été mise en évidence pour une concentration de sodium externe de 112 mM (cf. Chap. II).
Ce résultat paraît incompatible avec une action de l'hormone sur la perméabilité passive au sodium de la face muqueuse, mais suggère, au contraire, que l'hormone agit sur un mécanisme de transport actif.

Si l'hormone stimule la pompe à sodium à la face séreuse des cellules, le résultat doit être un abaissement de la concentration intracellulaire de sodium, permettant l'apparition d'un gradient de concentration favorisant l'entrée du sodium. Cet abaissement de la concentration intracellulaire devrait entrainer une diminution du flux sortant de sodium. Cela n'a pas été observé dans nos expériences, cependant, la variation a pu être trop faible pour être décelée ; la concentration de sodium pour laquelle l'action de l'hormone n'est plus apparente est 0,05 mM de sodium. Ceci indiquerait que la concentration intracellulaire, au moins dans le compartiment concerné par le transport, ne peut être abaissée par la pompe au-dessous de cette valeur. Cette pompe devrait donc être beaucoup plus efficace que les pompes d'échanges sodium-potassium étudiées dans d'autres tissus (19) auxquelles elle avait cependant été assimilée (26).

L'hypothèse d'un mécanisme de transport actif stimulable par l'hormone à la face muqueuse apparait beaucoup plus satisfaisante. Elle permet de rendre compte du fait que seul le flux entrant augmente sous l'action de l'hormone. En outre, elle permet d'expliquer plus facilement pourquoi le flux sortant de sodium est indépendant de la concentration de sodium externe entre 0,1 et 4 mM. En effet, par l'action conjuguée d'une pompe muqueuse et d'une pompe séreuse en série, la concentration intracellulaire de sodium, qui détermine le flux sortant, pourrait être maintenue constante, ce qui aurait l'avantage de ne pas modifier l'équilibre osmotique de la cellule et de

ramener les propriétés de la pompe séreuse aux propriétés connues pour les pompes existant sur tout le tour de la membrane cellulaire, contrôlées seulement par la concentration interne de sodium et maintenant la concentration intracellulaire de sodium aux environs de 20 à 30 mM.

Cependant, pendant la publication de ces résultats, des expériences destinées à étudier le même problème, étaient faites par CIVAN et al. (47) sur la vessie de crapaud. Bien que les résultats obtenus recoupent certains des nôtres, leur interprétation fait intervenir une quatrième hypothèse. En conséquence, une analyse de leur travail apparait nécessaire.

Dans le dispositif expérimental de CIVAN et al., le milieu séreux est du Ringer chlorure, le milieu muqueux, initialement du chlorure de sodium isotonique, est dilué progressivement avec une solution isotonique de saccharose. La différence de potentiel entre les deux milieux séparés par la vessie est mesurée avec des électrodes réversibles au chlorure (Ag - AgCl); elle reflète le gradient électrochimique pour le chlorure entre les deux milieux. Au début, la concentration de chlorure étant la même dans les deux milieux, la différence de potentiel entre ces électrodes mesure la différence de potentiel spontanée de la peau, due au transport actif de sodium. La dilution du milieu muqueux est arrêtée quand la différence de potentiel est nulle entre les électrodes Ag - AgCl ; ceci indique que la différence de potentiel due au mécanisme de transport actif de sodium est compensée par la différence de potentiel due à la diffusion du chlorure. La différence de potentiel électrochimique pour le chlorure étant nulle, le flux net de chlorure est nul puisque ses mouvements sont passifs. Le flux net de sodium est nul également car la vessie n'est pas court-circuitée et il ne peut y avoir un flux net de sodium sans flux net de chlorure associé. Ce dispositif permet donc de se placer exactement au point ou le flux net de sodium est nul à travers la face muqueuse. Une action hormonale sur la perméabilité passive ne peut entrainer aucune modification du potentiel électrochimique pour le chlorure. Au contraire, une augmentation du transport actif de sodium

entrainerait l'apparition d'une différence de potentiel. CIVAN et al obtiennent une stimulation du transport actif par l'hormone, ce qui est en accord avec nos résultats. En ce qui concerne l'amplitude de la réponse hormonale en fonction de la concentration de sodium externe, bien que les résultats concernant les concentrations de sodium manquent, des indications peuvent être déduites d'une courbe expérimentale montrant que l'amplitude de la réponse hormonale varie inversement à la différence de potentiel spontanée de la peau.

Comme ils montrent que le potentiel spontané est inversement proportionnel à la perméabilité de la vessie au chlorure, on peut en déduire que plus le potentiel spontané est élevé, plus la concentration de chlorure de sodium a dû être abaissée pour atteindre les conditions de flux nets nuls. Cette courbe signifie donc que la réponse hormonale est dépendante de la concentration de sodium; l'extrapolation à une réponse hormonale nulle donne une valeur du potentiel électrochimique pour le sodium de 170 mV tout à fait comparable à la valeur de 190 mV obtenue dans notre cas par une détermination expérimentale de l'effet de l'hormone sur le courant de court-circuit.

Ces résultats identiques aux nôtres sont interprétés en faisant appel à une hypothèse permettant de conserver une action hormonale sur la perméabilité passive de la face muqueuse : une partie du flux sortant de sodium passerait entre les cellules; le schéma de la figure 23 illustre cette hypothèse. Dans ce cas, le flux net réel au niveau de la face muqueuse peut être dirigé du milieu muqueux vers la cellule, et l'action de l'hormone, augmentant ce flux net jusqu'à inverser le flux net global de sodium peut s'expliquer par une perméabilité accrue de la face muqueuse. La difficulté principale d'une telle interprétation est qu'elle implique une concentration intracellulaire de sodium de l'ordre de 0,1 mM, en présence d'une concentration de 112 mM dans le milieu séreux.

Cependant, USSING (48) a montré que, lorsque le milieu muqueux est hypertonique au milieu séreux, le flux sortant de sodium est augmenté. Il suggère que cette augmentation est liée à l'élargissement des

espaces extracellulaires par suite de l'hypertonicité du milieu muqueux Nos expériences ne nous permettent pas d'évaluer l'importance d'une telle "fuite" intercellulaire de sodium, aussi, bien que l'hypothèse d'une action de l'hormone sur un mécanisme de transport actif au niveau de la face muqueuse nous paraisse la plus probable, une démonstration plus directe est nécessaire.

Quelques résultats préliminaires de ce travail ont été publiés (49, 50)

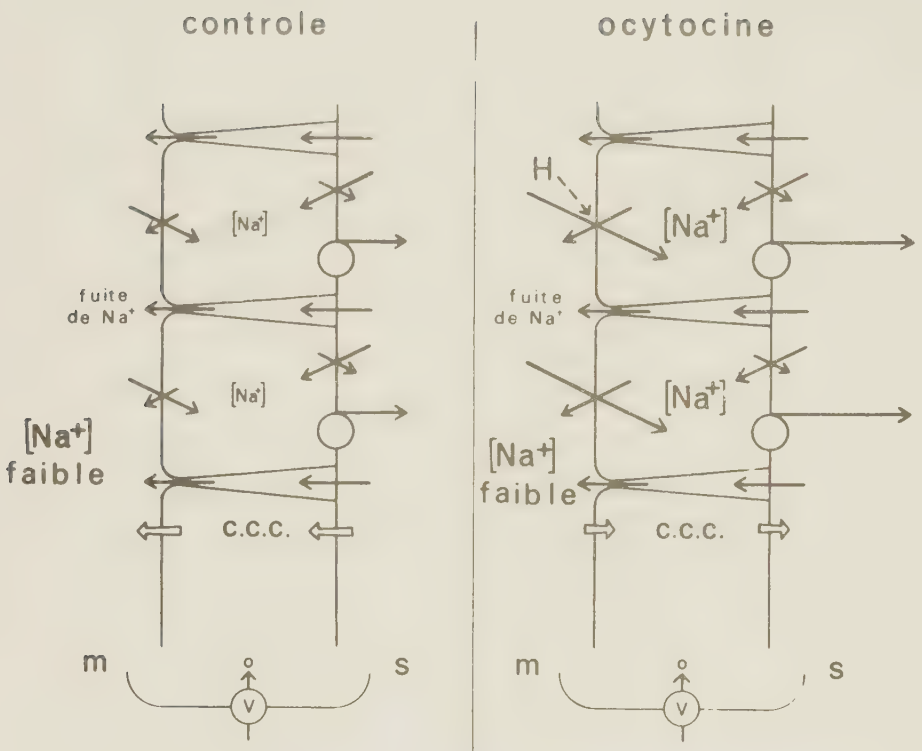


Fig. 23: Schéma illustrant l'action de l'ocytocine (H) sur le courant de court-circuit (C.C.C.) dans l'hypothèse où une partie du flux sortant de sodium passe entre les cellules.

CHAPITRE IV

ETUDE DE L'ACTIVITE ATPasique Na^+, K^+ - DEPENDANTE DE LA PEAU ET DE LA VESSIE.

INTRODUCTION

Depuis les travaux de SKOU (19), il a été de plus en plus fermement établi que le transport actif de sodium est dépendant d'un complexe enzymatique membranaire hydrolysant la liaison terminale γ de l'ATP. Ce complexe enzymatique, de la catégorie des ATPases, est activé par le sodium et le potassium, et inhibé spécifiquement, comme le transport lui-même, par l'ouabaine.

Dans le cas du globule rouge, POST (51) a établi que l'hydrolyse d'une molécule d'ATP fournit l'énergie nécessaire au transport de 3 ions sodium vers l'extérieur en échange de 2 ions potassium vers le milieu intracellulaire ; l'hydrolyse de l'ATP se fait en deux étapes : une kinase, activée par le sodium, transfère le phosphate γ de l'ATP sur un élément du complexe, puis une phosphatase, activée par le potassium, déphosphorylе le dérivé. On attribue le changement d'affinité nécessité par l'échange du Na^+ contre du K^+ à un changement de structure causé par la phophorylation. La présence d'une ATPase dépendant du Na^+ et du K^+ a été démontrée dans tous les tissus et en quantité plus importante dans ceux ou le transport de Na^+ est le plus intense : le système nerveux, et le rein (cf. Rev. 19).

Une telle activité ATPasique a également été mise en évidence par BONTING et al. (52) dans des broyats de peau et de vessie de grenouille. Sa localisation a été étudiée dans la peau par ROTUNNO et al. (53); l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante est suffisamment forte, même dans les couches superficielles de cellules épithéliales, pour rendre compte du transport actif de sodium ; malheureusement, elle se trouve en quantités équivalentes dans toute l'épaisseur de la peau, y compris le conjonctif, ce qui est tout à fait normal puisque le conjonctif contient de nombreuses glandes et des fibres musculaires.

A cause de cette hétérogénéité de la peau, il est difficile de dire si l'activité ATPasique, impliquée généralement dans la régulation de la concentration de Na^+ et de K^+ intracellulaire, joue aussi un rôle dans le transport actif de Na^+ à travers toute la peau, bien que plusieurs propriétés le laissent supposer : - le transport de sodium est inhibé par la présence d'ouabaïne dans le milieu séreux ; l'absence de potassium dans le milieu séreux inhibe également le transport de sodium, ce qui suggère la participation sur la face séreuse d'une "pompe" échangeant le sodium contre du potassium ; - bien qu'il ne soit pas démontré directement que l'ATP est la source de l'énergie nécessaire au transport, la relation stochiométrique entre la consommation d'oxygène et l'intensité du transport actif permet de calculer que 3 ions sodiums sont transportés par molécule d'ATP regénéré par le métabolisme (54) ce qui correspond bien aux conditions de travail d'une ATPase (51).

Au cours des dernières années, diverses techniques ont été mises au point, qui permettent d'obtenir des cellules épithéliales isolées de vessie (55, 56) ou de séparer l'épithélium pluristratifié de la peau de la couche de tissu conjonctif contenant les glandes (57). En partant de préparations ne contenant que des cellules épithéliales il est plus probable que l'activité ATPasique, qu'on peut mettre en évidence dans un broyat, soit en relation avec le transport actif de sodium à travers l'épithélium et que l'étude des propriétés de l'activité ATPasique permette d'aborder directement le mécanisme du transport. En effet, si l'entrée du sodium se fait passivement au niveau de la face muqueuse, d'après les résultats du chapitre III, la pompe à sodium sur la face séreuse est capable d'abaisser la concentration intracellulaire de sodium jusqu'à 0,05 mM ; elle diffère donc des systèmes de transport des autres tissus par sa capacité de transporter du sodium à partir d'un milieu beaucoup plus dilué, où le rapport Na^+/K^+ est très faible. On devrait donc mettre en évidence une ATPase moins inhibée par un excès de potassium, et activée par des concentrations de sodium plus basses que les ATPases des autres tissus, pour lesquelles ces facteurs

sont en corrélation avec la capacité du mécanisme de transport (58). S'il existe un mécanisme de transport actif de sodium sur la face muqueuse, l'ATPase liée au transport à la face séreuse peut ne présenter aucune propriété distinctive, mais le système de transport muqueux, à condition qu'il utilise l'ATP comme source d'énergie, devrait se manifester comme une activité ATPasique différente, activée par de très basses concentrations de sodium. En outre, si l'ocytocine produit son effet natriférique en stimulant un mécanisme de transport actif plutôt qu'en augmentant la perméabilité passive de la face muqueuse, on doit pouvoir mettre en évidence un effet sur l'activité ATPasique du médiateur intracellulaire de l'hormone : l'AMP cyclique ; puisque l'ocytocine augmente l'affinité apparente pour le sodium du système de transport et sa vitesse, on devrait trouver un effet analogue de l'AMP cyclique sur l'activité ATPasique.

Les résultats rapportés dans ce chapitre représentent l'état actuel d'un travail encore en cours sur l'activité ATPasique de cellules épithéliales de vessie et de peau. La plus grande partie des résultats concerne l'ATPase de préparations de vessie, car c'est sur cette structure que les techniques d'isolement des cellules épithéliales ont été mises au point les premières et que la préparation de l'extrait enzymatique est la plus facile ; nous avons vérifié que l'activité ATPasique de l'épithélium de peau avait les mêmes caractéristiques.

Après avoir contrôlé les conditions d'isolement des cellules épithéliales, nous avons étudié les caractéristiques de l'activité ATPasique Na^+, K^+-dépendante, et tout particulièrement l'activation en fonction de la concentration de sodium. Afin de comparer directement les résultats obtenus avec les propriétés de l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante bien étudiées sur d'autres tissus, nous avons cherché un tissu de la grenouille pouvant fournir une telle activité ATPasique. En effet les activités ATPasiques des différents tissus ont des propriétés identiques, mais la température optimale est plus élevée pour les tissus provenant de mammifères (37°) que pour les tissus provenant

de poïkilothermes (26°) (59), aussi il était préférable de prendre un tissu provenant du même animal. Le cerveau de grenouille a été choisi pour cette comparaison : il contient une quantité importante d'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante; d'autre part l'ATPase du cerveau de mammifère a été l'objet de nombreuses études.

Nous avons étudié les effets de l'AMP cyclique (médiateur intracellulaire de l'action des hormones neurohypophysaires) sur l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante de la vessie. En outre, comme l'aldostérone augmente le transport actif de sodium à travers la peau (10, 60) et la vessie (9,11, 12, 13), nous avons regardé comment l'activité ATPasique était modifiée par un traitement préalable des grenouilles à l'aldostérone, ou par une adaptation à un milieu riche en sodium, qui provoque une forte diminution de la sécrétion endogène d'aldostérone (10).

Techniques

Animaux : les expériences ont été faites sur des grenouilles Rana esculenta maintenues à jeun dans l'eau courante à la température ordinaire, sauf dans le cas ou l'action de l'aldostérone a été étudiée. Dans ce cas une partie des grenouilles a été adaptée au Ringer pendant 15 jours, l'autre partie a été conservée dans l'eau distillée et les animaux ont reçu en outre une injection journalière de 5 µg d'aldostérone les quatre derniers jours précédant le sacrifice.

Préparation de l'extrait enzymatique : les vessies et éventuellement les peaux de 10 grenouilles sont prélevées, rincées au tampon Tris-HCl, pH 7,4, 0,1 M, puis séchées sur gaze et conservées à -20°.

Isolement des cellules épithéliales de vessie, méthode 1 :

Cette méthode, décrite par HAYS et al. (55) et adaptée à nos conditions expérimentales avec quelques modifications, consiste à complexer le calcium par de l'E.D.T.A. $1,5.10^{-3}$ M ; l'absence de calcium entraine le détachement des cellules, les unes des autres, et de la membrane basale qui les supporte. Les vessies, après décongélation, sont coupées

en morceaux et agitées pendant 30 minutes à 0 dans 10 ml d'un milieu contenant de l'E.D.T.A. - Tris, pH 7,4, $1,5.10^{-3}$ M, et du Tampon Tris-HCl, pH 7,4, 10^{-4} M ; les fragments de membrane basale supportant le conjonctif sont retenus par filtration sur gaze, et les cellules isolées présentes dans le filtrat sont recueillies par centrifugation à 15.000 g, 15 min, 2°.

Une étude au microscope électronique, faite par P. FAVARD montre que le culot contient principalement des cellules épithéliales isolées, dont la membrane semble intacte mais dont le cytoplasme est fréquemment vacuolisé. Après un bref lavage dans un milieu de saccharose isotonique, la concentration en sodium et potassium de ces cellules est très faible, ce qui montre que la membrane est devenue complètement perméable.

Isolement des cellules épithéliales de vessie, méthode 2 :

Cette méthode, décrite par GATZY et al. (56) consiste à dissocier la membrane basale par la collagénase. Les vessies décongelées et coupées en morceaux sont incubées 30 min. à 35° dans 5 ml d'un milieu contenant de la collagénase : 40 µg/ml, du calcium : 2.10^{-3} M et du Tampon Tris -HCl : pH 7,4 ; 0,1 M. Les cellules sont détachées par une agitation vigoureuse, le conjonctif est retenu par filtration comme précédemment et les cellules recueillies par centrifugation à 500 g, 30min. Cette méthode a été seule utilisées dans les préparations des 8 derniers mois car elle donne une activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante de façon plus reproductible que la méthode 1.

Isolement de l'épithélium de la peau : la méthode 2 s'est avérée utilisable dans le cas de la peau. Après incubation à la collagénase, l'épithélium est détaché du tissu sous-jacent à la pince. L'observation au microscope électronique montre que l'épithélium conserve sa structure pluristratifiée intacte avec les cellules superficielles attachées au niveau des barres terminales.
Aucune glande n'est entrainée avec l'épithélium.

Préparation d'extraits partiellement solubilisés : dans le cas où la méthode 1 a été employée, le culot de cellules isolées est solubilisé par traitement au Désoxycholate de Tris pH 7,4, 1 ‰ pendant 10 min. à 0°, dans un milieu dont la composition est la suivante : Tris- HCl pH 7,4 10^{-2} M, E.D.T.A. - Tris $1,5.10^{-3}$ M, ATP 10^{-5} M, Mg^{++} 2.10^{-3} M, puis dialysée à 0° pendant 16 h contre 2 l. d'E.D.T.A. - Tris, pH 7,4, $1,5.10^{-3}$M, pour éliminer le plus possible de sodium et de calcium. L'extrait obtenu est homogène et ne sédimente plus spontanément. Dans le cas ou la méthode 2 a été utilisée, le culot de cellules isolées est solubilisé dans 2 ml de citrate-Tris, pH, 7,4, 0,1 M contenant de l'E.D.T.A.-Tris pH 7,4, 1.10^{-3}M ; après 1 heure à 0°, la préparation est dialysée comme précédemment. Dans le cas de l'épithélium de peau, les épithéliums sont congelés avec de l'azote liquide et broyés au mortier. Après centrifugation à 15.000 g pendant 15 minutes le culot est traité au Désoxycholate dans les mêmes conditions que dans la première méthode décrite pour la vessie, mais une importante fraction insoluble doit être éliminée par centrifugation à 500 g, 15 min.

Préparation de l'extrait enzymatique de cerveau de grenouille :

2 à 5 cerveaux fraichement prélevés sont broyés à l'aide d'un potter à piston de teflon dans un milieu composé de Tris-HCl, pH 7,4, 10^{-2}M, E.D.T.A.-Tris, pH 7,4, $1,5.10^{-3}$M. La suite de la préparation est menée de la même façon que pour les cellules épithéliales de vessie (méthode 1).

Les extraits enzymatiques ainsi obtenus conservent leur activité pendant 8 à 15 jours à 4° C.

Mesure de l'activité ATPasique. 10 à 20 µg d'extrait enzymatique sont préincubés une heure à 30° dans un milieu contenant : Tris-HCl, pH 7,4 100mM ; Mg^{++}, 2 mM ; K^{+}, 5 mM, Na^{+} en concentration variable. Des témoins contenant en plus de l'ouabaine : 0,1 mM, sont préparés parallèlement de façon à mesurer l'activité de l'ATPase Mg^{++} dépendante. La réaction commence par l'addition d'ATP (2 mM dans 0,5 ml de milieu d'incubation),et se poursuit pendant 30 min. à 30°. La réaction est

arrêtée à 0° par addition de 0,2 ml de T.C.A. à 10 %. Le phosphate libéré est mesuré par une méthode colorimétrique : soit celle de FISKE et al. (61) soit celle de POST (62).

Mesure du dérivé phosphorylé

40 à 70 µg d'extrait enzymatique sont pré-incubés à 0° dans le même milieu que précédemment, mais ne contenant pas de potassium; la réaction commence par l'addition d'ATP contenant environ 5000 ipm d'ATP $\gamma^{32}P$ comme traceur radioactif, à la concentration finale de $5.10^{-7}M$. et se poursuit pendant 1 minute à 0°. La réaction est arrêtée après 1 min. à 0° par l'addition de 0,2 ml de T.C.A. 10 % contenant de l'ATP froid ($10^{-3}M$) comme entraineur. Le précipité obtenu est immédiatement filtré sur millipore et rincé avec 20 ml de TCA 1 %. Les filtres sont ensuite collés sur des coupelles, séchés et comptés avec un passeur automatique de coupelles équipé d'un compteur Geiger.

Mesure de l'activité phophatasique

40 à 70 µg d'extrait enzymatique sont pré-incubés dans les mêmes conditions que pour la mesure de l'activité ATPasique. La réaction est commencée par addition de Paranitrophénylphosphate (PNPP) et arrêtée par addition de 2 ml de soude 0,312 M ; la concentration de paranitrophénol libéré par la réaction est mesurée au spectrophotomètre à 410mµ

La concentration des protéines dans l'extrait enzymatique est mesurée par la méthode de LOWRY et al. (63).

Produits utilisés

Adénosine triphosphate (ATP) forme acide (SIGMA); ATP$\gamma^{32}P$ 1 Ci/mM (CEA - Saclay); Para-nitrophénylphosphate (PNPP). (SIGMA). Le sel de sodium du PNPP est passé sur une colonne de DOWEX 50 forme H^+. Le PNPP sous forme acide ainsi obtenu est neutralisé au Tris.; AMP cyclique (SCWARTZ Bioresearch); Ouabaine (MERK, Darmstadt); Aldostérone (ALDOCORTEN CIBA); Tris (Hydroxyméthyl) aminométhane (Tris), (Trizma base, SIGMA); Acide éthylène-diamino tétra-acétique (EDTA) (PROLABO); Acide désoxycholique (MANN); Acide trichlore-acétique (TCA) (MERCK, Darmstadt); Millipore 13 mm HAWP 0,45 µ

RESULTATS

A. CARACTERISTIQUES GENERALES DE L'ACTIVITE ATPasique

Les extraits de cellules épithéliales de vessies contiennent comme ceux des autres tissus, deux sortes d'activités ATPasiques. L'une, dont le seul ion activateur est le magnésium, est appelée ATPase Mg^{++} - dépendante, elle est en quantité spécialement importante dans la vessie ; son activité spécifique est d'environ 8 µ Moles de phosphate libéré par heure et mg de protéines ; l'autre sorte d'activité ATPasique est activée par la présence simultanée de magnésium, de sodium et de potassium. Elle est mesurée par la différence entre l'activité ATPasique totale en présence de Mg^{++}, Na^{+} et K^{+} et l'activité ATPasique dans le même milieu, contenant de l'ouabaine (l'ouabaine inhibe spécifiquement l'ATPase Na^{+}, K^{+} - dépendante). L'activité ATPasique Na^{+}, K^{+} - dépendante de la vessie apparait très labile : les diverses techniques proposées pour diminuer la proportion d'ATPase Mg^{++} - dépendante dans les extraits de rein (64) et de cerveau (65) entrainent aussi la disparition de l'activité ATPasique Na^{+}, K^{+} - dépendante dans ce tissu. Seul, un traitement modéré au désoxycholate produit un effet favorable en augmentant l'activité de l'ATPase Na^{+}, K^{+} - dépendante d'un facteur 1,5 à 2. Ce traitement est décrit dans la méthode 1 ; quand la méthode 2 a été utilisée, l'extrait a été traité avec du désoxycholate 0,4 %, pendant 10 min. à 0° juste avant son utilisation.

La fragilité de l'ATPase Na^{+}, K^{+} dépendante de vessie explique probablement que son activité soit extrêmement variable d'une préparation à l'autre : elle représente de 0 à 30 % de l'activité ATPasique totale ; seules les préparations dont l'activité Na^{+}, K^{+} - dépendante représente au moins 20 % de l'activité ATPasique totale peuvent être utilisées pour une étude détaillée, parce que la précision de la mesure (faite par différence) est alors suffisante.

L'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante extraite d'épithélium de peau représente fréquemment de 30 à 50 % de l'activité ATPasique totale ; Cependant, la plus grande partie de l'épithélium (environ 90 %) demeure insoluble et doit être éliminée, ce qui explique probablement que 10 épithéliums, bien que leur surface soit plus grande que celle de la vessie et qu'il y ait plusieurs couches de cellules épithéliales, fournissent seulement environ 0,7 mg d'extrait enzymatique alors que les cellules épithéliales de 10 vessies en fournissent environ 3 mg. Aussi, bien que les conditions du dosage de l'ATPase Na^+, K^+ - dépendante soient meilleures dans le cas de la peau, nous avons fait la plupart des expériences sur l'activité ATPasique de vessie, plus abondante ; seules des expériences de contrôle ont été faites sur la peau.

B. ACTIVATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION DE SODIUM

Lorsque l'on fait varier la concentration de sodium dans le milieu d'incubation de 6.10^{-5} à 10^{-1}M, les autres cations restant à concentration constante, l'activation de l'ATPase Na^+, K^+ - dépendante présente deux plateau successifs ; un exemple de ce comportement, qui a été reproduit de nombreuses fois, est illustré par la figure 24 . La première activation observée (ATPase I) présente un plateau, quelquefois très étroit, pour des concentrations de sodium comprises entre 3 mM et 10 mM; la deuxième activation (ATPase II), d'amplitude plus grande, est obtenue pour des concentrations de sodium plus élevées, comprises entre 30 mM et 100 mM. Des concentrations de sodium supérieures sont inhibitrices. La présence d'une diminution de l'activité ATPasique entre les optimums des ATPase I et II n'est pas toujours observée (cf. figure 25).

L'extrait enzymatique d'épithélium isolé de peau a exactement les mêmes caractéristiques d'activation en fonction de la concentration de sodium ; un exemple est reproduit sur la figure 25.

Nous avons vérifié sur des extraits enzymatiques de cerveau de grenouille que l'activation observée aux basses concentrations de sodium n'était pas due à nos conditions expérimentales : ces extraits

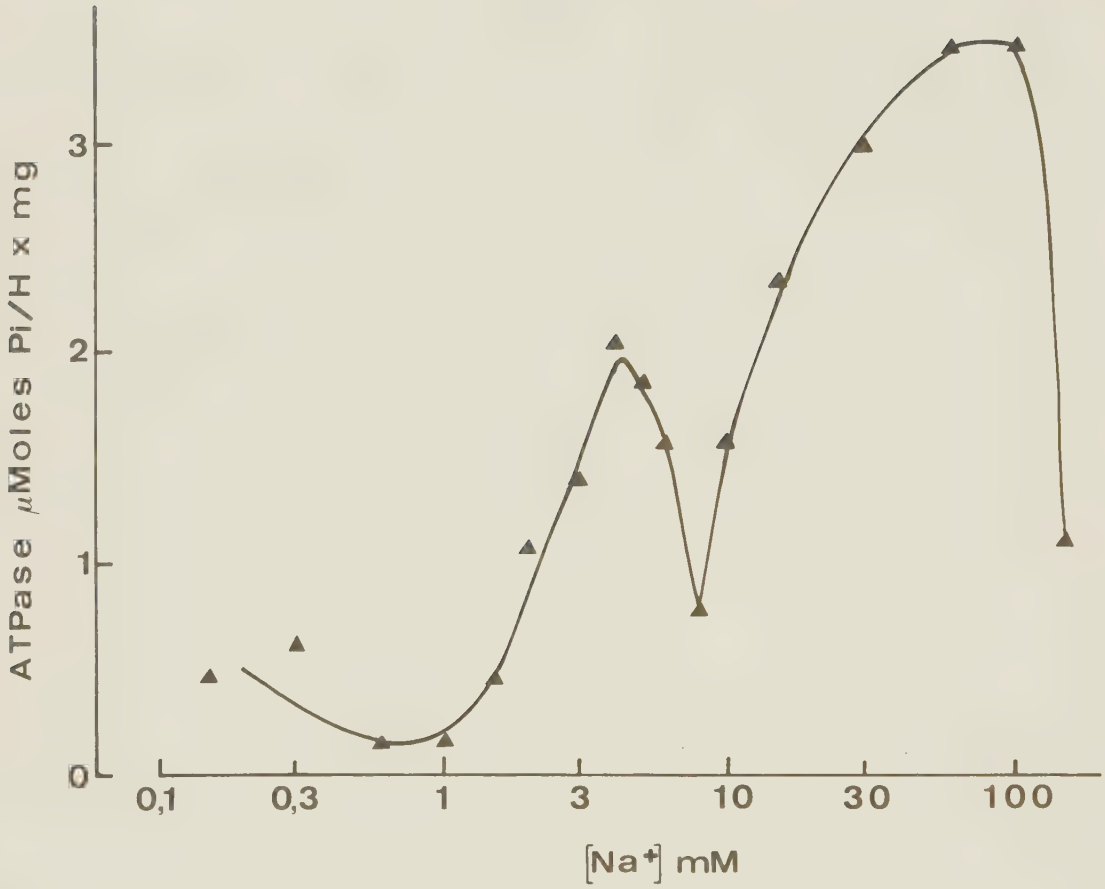


Fig. 24: Activité ATPasique Na^+,K^+-dépendante d'un extrait enzymatique de cellules épithéliales de vessies, en fonction de la concentration de sodium

En ordonnées: l'activité ATPasique Na^+,K^+-dépendante exprimée en µ Moles de phosphate (Pi) libéré par heure et mg de protéïnes dans l'extrait enzymatique. Cette activité a été calculée par la différence entre l'activité ATPasique totale, dans un milieu contenant du Na^+ à la concentration indiquée en abscisses, et l'activité ATPasique Mg^{++}-dépendante, dans le même milieu contenant en outre de l'ouabaïne (10^{-3}M). La concentration des autres ions est indiquée dans la section "Méthodes". En abscisses, la concentration en Na^+ portée sur une échelle logarithmique. L'extrait enzymatique a été préparé par la méthode 2.

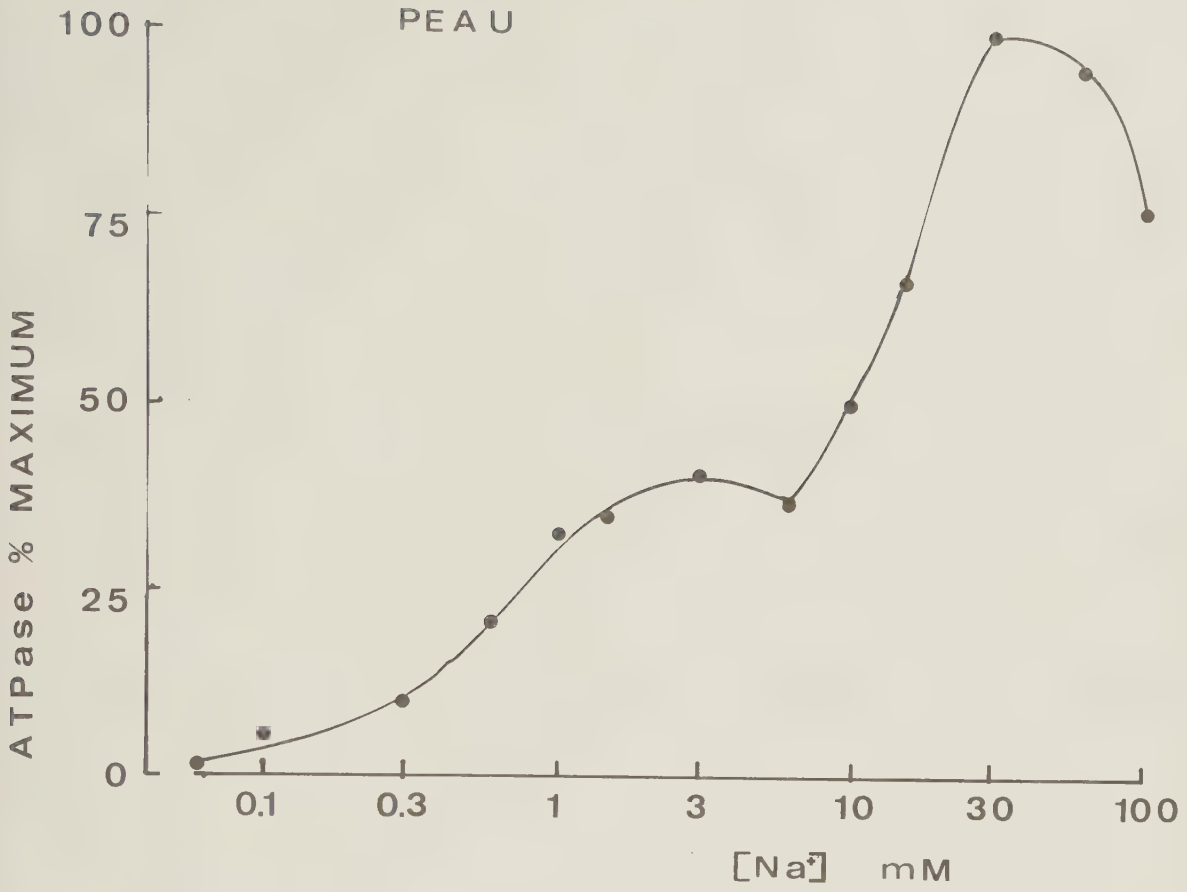


Fig. 25: Activité ATPasique Na^+,K^+-dépendante d'un extrait enzymatique d'epithélium de peau, en fonction de la concentration de sodium.

En ordonnées, l'activité ATPasique Na^+,K^+-dépendante, en % de l'activité maximale . En abscisses, la concentration de sodium dans le milieu, portée sur une échelle logarithmique. La préparation de l'extrait et les conditions de dosage sont indiquées dans la section "méthodes" . La concentration de proteine n'a pas été mesurée sur cet extrait.

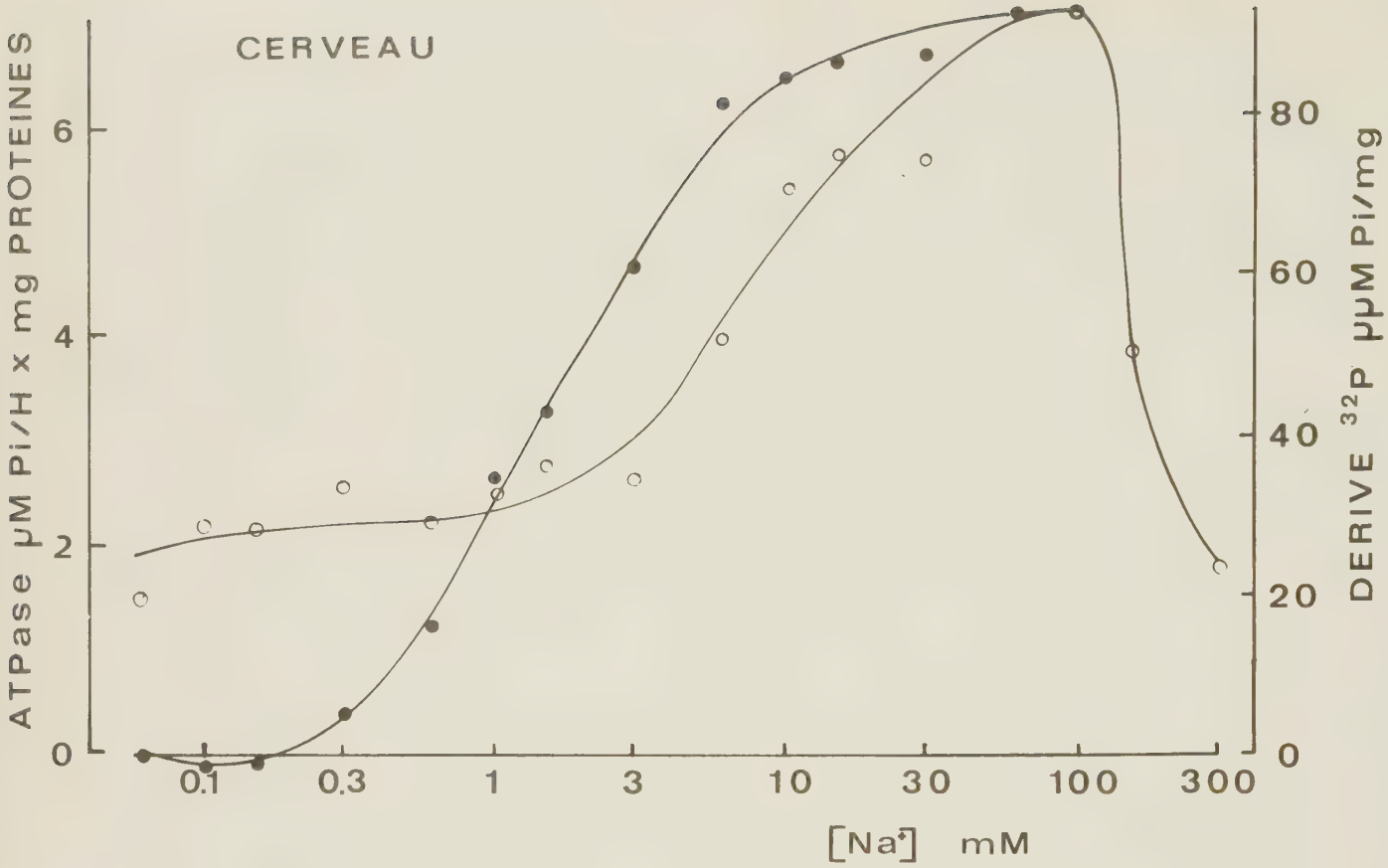


Fig. 26: Activité ATPasique Na^+, K^+-dépendante et quantité de dérivé phosphorylé formé en fonction de la concentration de sodium dans un extrait enzymatique de cerveau de grenouille.

En ordonnées, à gauche, l'activité ATPasique Na^+, K^+-dépendante (cf. Figure 24) (points blancs), à droite, la quantité de dérivé phosphorylé Na^+-dépendant, (points noirs) mesuré par différence entre la quantité de dérivé phosphorylé formé dans un milieu ne contenant pas de K^+, et la quantité de dérivé phosphorylé mesuré dans le même milieu contenant du K^+ (5 mM) (cf. Figure 27). En abscisses, la concentration de Na^+ dans le milieu, portée sur une échelle logarithmique.

enzymatiques de cerveau ont été préparés en même temps et de la même façon que les extraits de vessie ; l'activité ATPasique des deux extraits a été mesurée au cours de la même expérience.

L'activité ATPasique de l'extrait de cerveau présente un seul optimum (fig. 26) pour une concentration de sodium de 60 mM, identique à l'optimum de l'ATPase II de la vessie. L'ATPase Na^+, K^+ - dépendante de cerveau a une activité spécifique d'environ 20 µ Moles de phosphate libéré par heure et mg de protéines et représente 60 % de l'activité ATPasique totale.

C. COMPARAISON DE L'ATPase II DE VESSIE A L'ATPase DE CERVEAU

A la concentration de sodium de 60 mM, optimale pour l'ATPase II de vessie, les caractéristiques de l'activité ATPasique de vessie sont identiques à celles de l'activité ATPasique de cerveau : - la dépendance du pH n'est pas très importante entre 6,8 et 8,4 et présente un optimum voisin de 7,4 - l'ouabaine produit une inhibition complète à la concentration de 10^{-3} M, une inhibition de 50 % (Ki) est obtenue pour une concentration de 5.10^{-7}M dans le cas de la vessie et de 4.10^{-7}M dans le cas du cerveau. - l'activation par le potassium est optimale à la concentration de 5 mM dans les deux cas; des concentrations supérieures sont inhibitrices.

Formation d'un dérivé phosphorylé

Il est possible d'étudier séparément les deux activités enzymatiques, constituant l'ATPase Na^+, K^+ - dépendante ; en effet la kinase, qui phosphorylle un élément du complexe enzymatique est activée en présence de sodium seul, alors que la phosphatase qui déphosphorylle le dérivé phosphorylé formé par la kinase exige du potassium dans le milieu pour fonctionner. En l'absence du potassium, le dérivé phosphorylé par la kinase s'accumule, car la réaction est peu réversible ; il est donc possible d'étudier l'activation de la kinase par le sodium en mesurant la quantité de dérivé phosphorylé formé en fonction de la concentration de sodium.

La fig. 27 présente une telle expérience faite sur un extrait enzymatique de vessie. La quantité de dérivé phosphorylé formé est

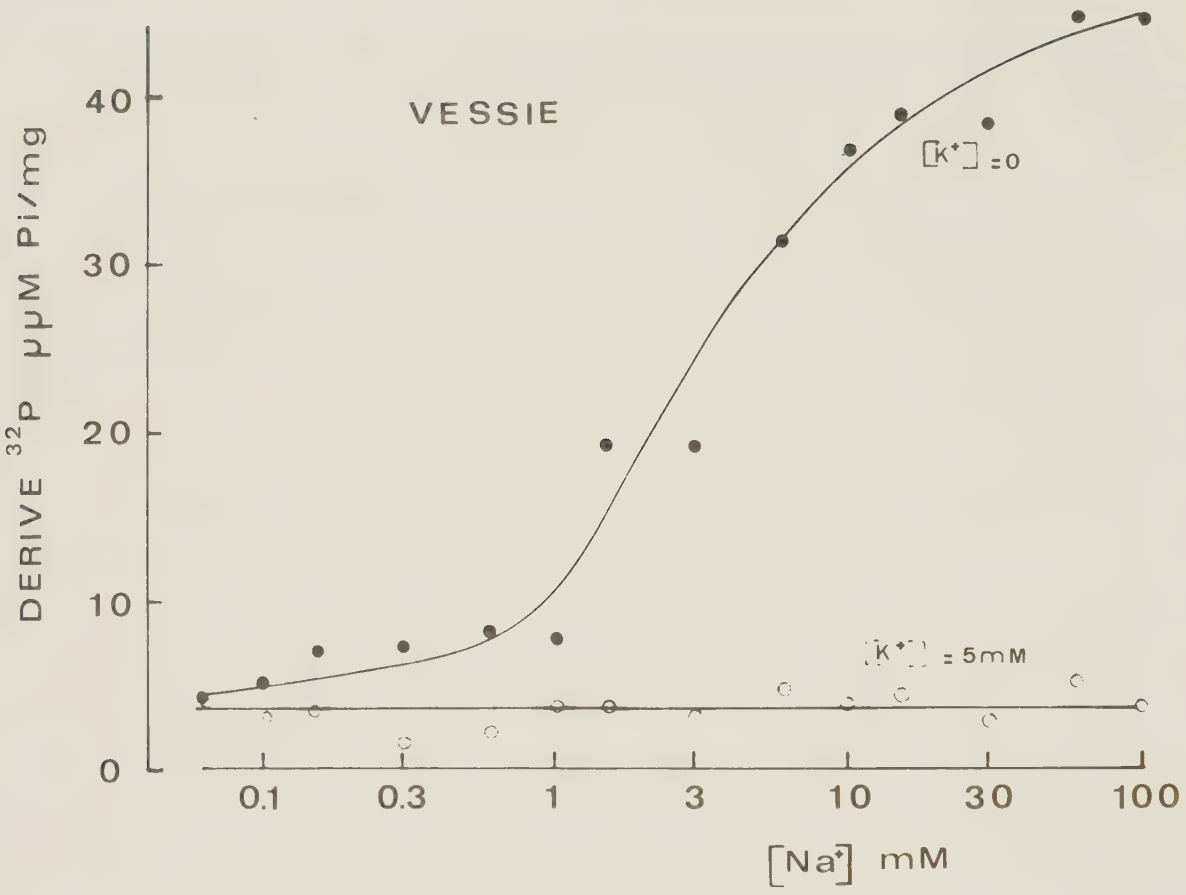


Fig. 27: Formation du dérive phosphorylé en fonction de la concentration de sodium dans un extrait enzymatique de vessie.

En ordonnées: la quantité de dérivé phosphorylé formé, exprimée en µµ Moles de Phosphate (Pi) incorporés par mg de protéïnes. En abscisses, la concentration de sodium dans le milieu, portée sur une échelle logarithmique. Les conditions de mesures sont décrites dans la section "Méthodes". La préparation de l'extrait enzymatique a été faite par la méthode 1. La quantité de dérivé phosphorylé formée a été mesurée, soit dans un milieu ne contenant pas de K^+ (points noirs), soit dans un milieu contenant du K^+ (5 mM) (points blancs); en présence de K^+, l'incorporation de phosphate par l'extrait enzymatique ne dépend pas de la concentration de sodium. La quantité de dérivé phosphorylé Na^+-dépendant représente la différence entre la quantité de dérivé phosphorylé, mesurée en l'absence de K^+, et la quantité de dérivé phosphorylé mesurée en présence de K^+, car dans cette condition le dérivé phosphorylé Na^+-dépendant est détruit par la phosphatase K^+-dépendante de l'ATPase.

maximale pour une concentration de sodium de 100 mM, avec une demi activation maximale à 3 mM; dans le cas du cerveau, la courbe obtenue est identique (cf. figure 26). En présence de potassium, la phosphatase détruisant le dérivé phosphorylé; la phosphorylation est la même quelle que soit la concentration de sodium ; elle est probablement liée à l'activité de l'ATPase Mg^{++} - dépendante. Un dérivé phosphorylé identique est obtenu avec un extrait enzymatique d'épithélium de peau. La courbe d'activation par le sodium ne présente aucun palier pour des concentrations correspondant à celles qui activent l'ATPase I, ni dans le cas de la vessie ni dans le cas de la peau.

Phosphatase K^+ dépendante.

La mesure de l'activité phosphatasique peut se faire indépendamment de l'activité ATPasique en substituant un substrat phosphorylé artificiel, le PNPP, au substrat naturel.
En effet, en présence de petites quantités d'ATP (10^{-3}M) et de sodium (10^{-3}M), il est possible de mettre en évidence une activité phosphatasique hydrolysant le PNPP (66). Cette activité, dépendant du potassium et inhibée par l'ouabaïne, correspond par ses propriétés à l'activité phosphatasique mise en évidence directement par l'étude de la déphosphorylation du dérivé phosphorylé (67). Nous n'avons pas trouvé de conditions dans lesquelles la phosphatase K^+ - dépendante soit très active dans le cas de la vessie ; son activité spécifique est 0,8 µMoles de PNPP hydrolysé par heure et mg de protéines ; elle représente 20 % de l'activité phosphatasique totale après traitement au désoxycholate 1 % . Ses propriétés sont identiques à celles de la phosphatase correspondante de cerveau de grenouille : au-dessus de 20 mM de potassium, l'activation est maximale ; la demi-activation est obtenue à 3 mM de potassium ; - l'inhibition par l'ouabaïne est totale pour une concentration de 10^{-4}M ; la demi-inhibition est obtenue pour : 5.10^{-} M; - des concentrations de sodium supérieures à 10 mM sont inhibitrices. Nous n'avons pas encore étudié l'activité phosphatasique de la peau.

D. ACTION DE L'AMP CYCLIQUE SUR L'ACTIVITE ATPasique Na^+, K^+ - DEPENDANTE DE LA VESSIE

La figure 28 présente une expérience montrant l'action de l'AMP cyclique en fonction de la concentration de sodium. L'AMP cyclique augmente de façon identique l'amplitude des deux plateaux d'activité ATPasique ; l'augmentation de l'activité à 100 mM de sodium peut être due à l'effet additif à cette concentration de sodium, de l'activité de l'ATPase I, augmentée par l'AMPcyclique et de l'activité de l'ATPase II ; il n'est donc pas certain que l'activité de l'ATPase II soit modifiée par l'AMPcyclique. Outre l'activation de l'ATPase I, l'AMP cyclique diminue la concentration de sodium produisant 50 % de l'activation maximale de l'ATPase I (km apparent). La figure 29 montre les résultats d'une autre expérience, portée en coordonnées directes en fonction de la concentration de sodium, où la diminution du km apparent pour le sodium est très marqué. L'activité ATPasique de cerveau n'est pas modifiée par l'AMPcyclique.

E. ACTION DE L'ALDOSTERONE SUR L'ALDOSTERONE SUR L'ACTIVITE ATPasique Na^+, K^+ - DEPENDANTE DE LA PEAU ET DE LA VESSIE

L'adaptation des grenouilles à un milieu de Ringer, riche en sodium,provoque une diminution marquée du transport actif de sodium, due à la diminution de la sécrétion d'aldostérone endogène. Nous avons l'indication que l'activité ATPasique I est plus faible par rapport à l'ATPase II chez ces animaux, comparés à des animaux témoins, conservés dans l'eau désionisée et injectés à l'aldostérone, ce qui diminue la variabilité du transport de sodium d'un animal à l'autre (68). Le tableau X présente l'activité des ATPase I et II mesurées respectivement à 6 et 60 mM de sodium.

La figure 30,représentant l'expérience effectuée sur des extraits enzymatiques d'épithélium de peau,montre qu'il n'y a pas de déplacement des concentrations optimales pour les ATPases I et II mais une modification de l'activité de l'ATPase I.

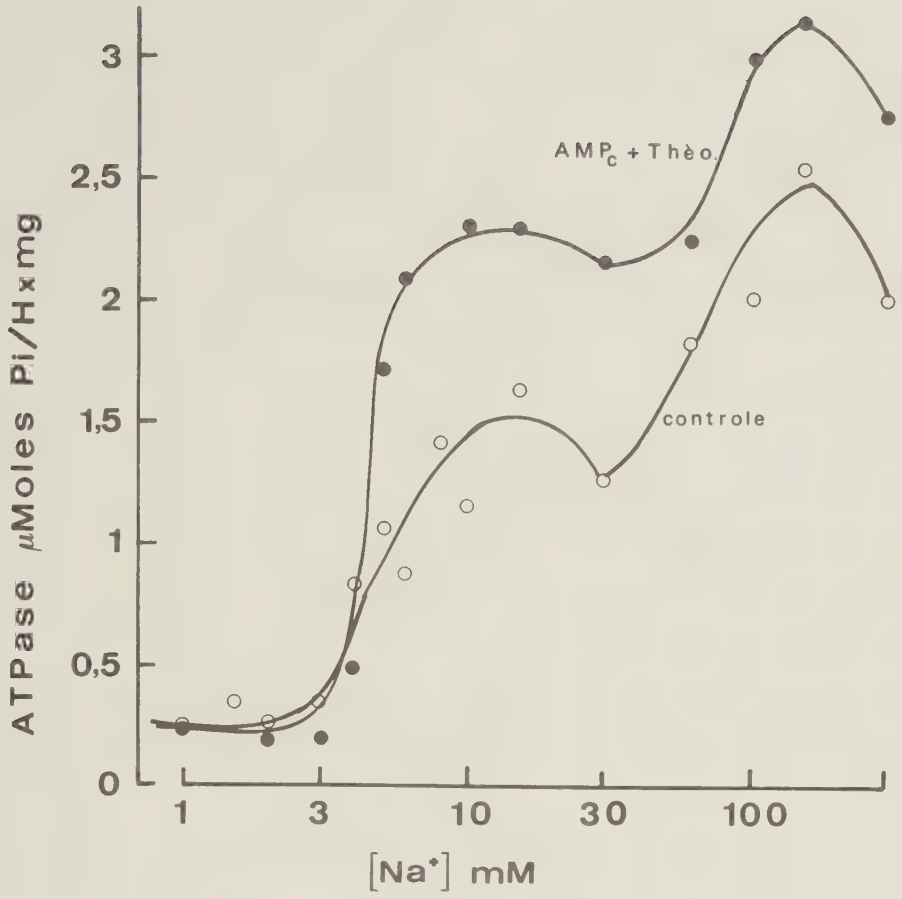


Fig. 28: Action de l'AMP cyclique sur l'activité ATPasique Na^+, K^+-dépendante de cellules épithéliales isolées de vessie, en fonction de la concentration de sodium.

La détermination de l'activité ATPasique Na^+, K^+-dépendante, portée en ordonnées, est indiquée dans la section"méthodes". Le milieu d'incubation est décrit dans la section "méthodes", à l'exception de la concentration de sodium, variable, portée sur une échelle logarythmique, et contenait en outre de l'AMP cyclique et de la théophylline, comme indiqué sur la figure.

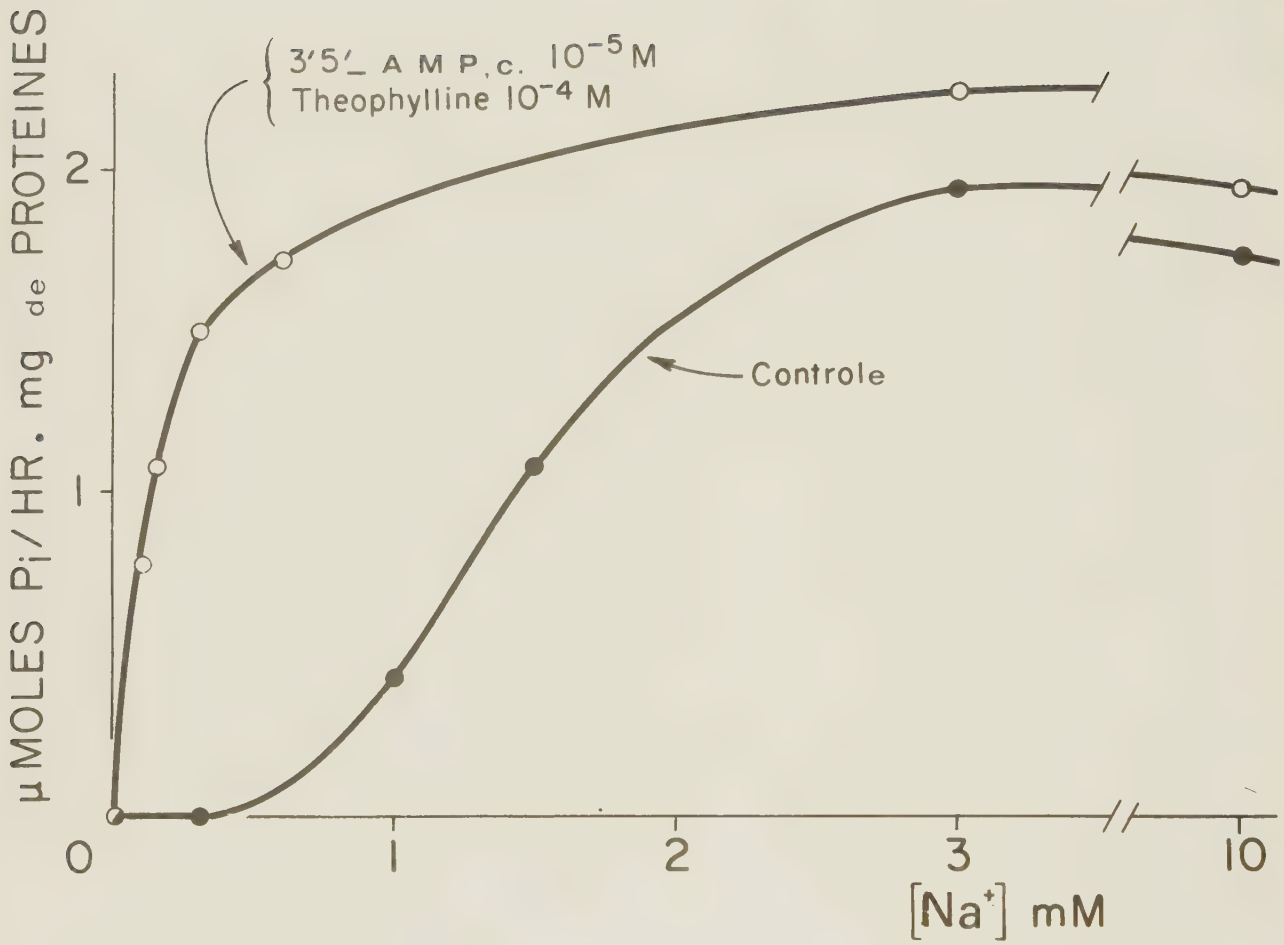


Fig. 29: Action de l'AMP cyclique sur le Km apparent du sodium dans le cas de l'ATPase I d'une préparation d'extrait enzymatique de vessie.

En ordonnées: l'activité ATPasique Na^+,K^+-dépendante. En abscisses, la concentration de sodium dans le milieu. Le Km apparent désigne la concentration de sodium pour laquelle l'activité ATPasique atteint 50 % de son activité à 6 mM de sodium.

Les concentrations d'AMP cyclique et de théophylline sont indiquées sur la figure. Les conditions de dosages de l'activité ATPasique sont décrites dans la section "Méthodes". L'extrait enzymatique de cellules épithéliales de vessie a été préparé selon la méthode 1.

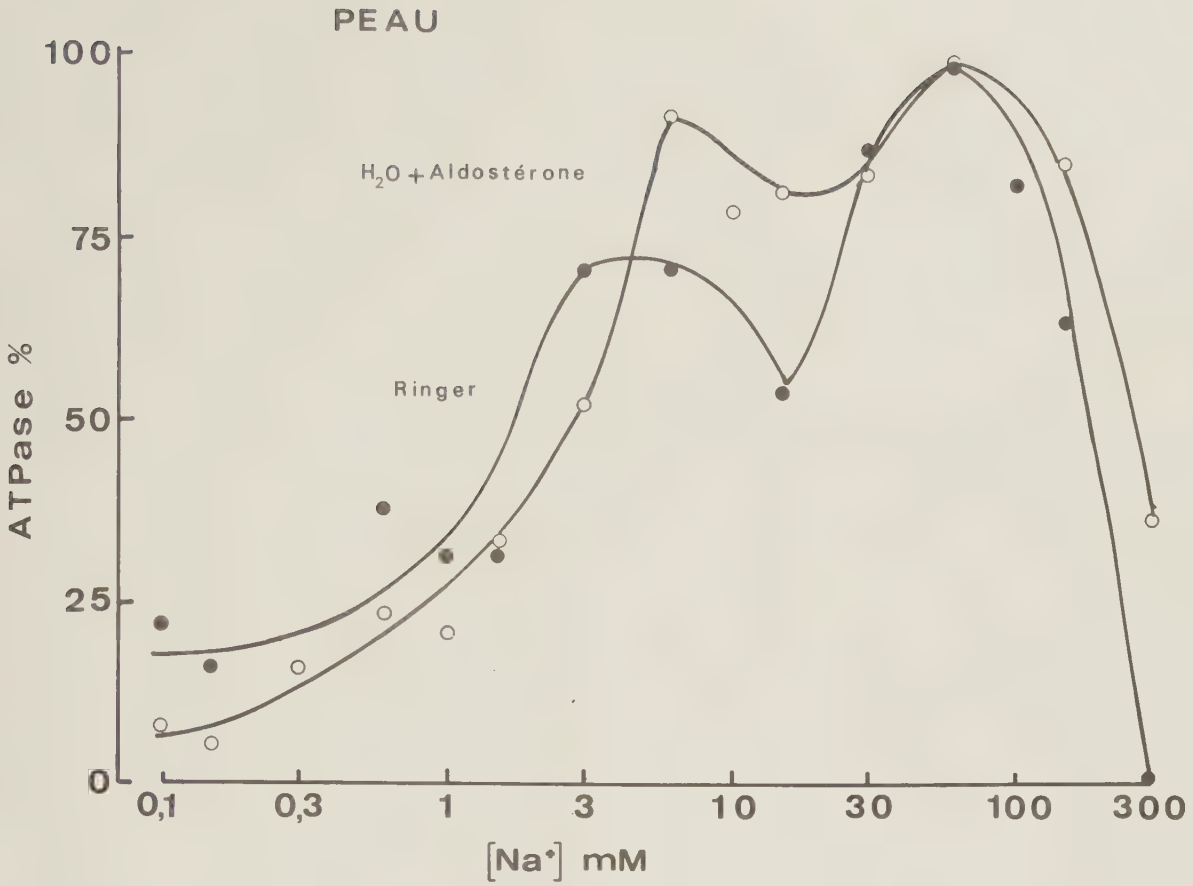


Fig. 30: Action de l'aldostérone sur l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante d'épithéliums de peau en fonction de la concentration de sodium.

En ordonnées, l'activité ATPasique, exprimée en % de l'activité ATPasique à 60 mM de sodium; en abscisses, la concentration de sodium dans le milieu d'incubation, portée sur une échelle logarythmique. Les extraits enzymatiques proviennent, soit d'un lot de 10 grenouilles adaptées à un milieu contenant 112 mM de sodium (Ringer) pendant 15 jours à 10° (points noirs), soit d'un lot de 10 grenouilles conservées dans l'eau désionisée dans les mêmes conditions, et ayant subi une injection journalière de 5 µg d'aldostérone pendant 4 jours avant le sacrifice (points blancs).

TABLEAU X

ACTION DE L'ALDOSTERONE SUR LES ATPases I ET II DE VESSIE ET DE PEAU DE GRENOUILLE

Pour chaque expérience, l'activité ATPasique à 6 mM (optimum de l'ATPase I) et à 60 mM de sodium (optimum de l'ATPase II), exprimée en µMoles de phosphate (Pi) libérées par heure et mg de protéines, est comparée pour 1 lot d'animaux témoin conservés dans le Ringer pendant 15 jours ce qui diminue la sécrétion endogène d'aldostérone, et pour 1 lot d'animaux conservés dans l'eau désionisée, et injectés avec de l'aldostérone; le pourcentage de l'activité ATPasique à 6 mM de sodium en fonction de l'activité ATPasique à 60 mM de sodium (I/II) a été calculé pour faciliter la comparaison.

	Lot témoin (Ringer)			Lot traité à l'aldostérone		
	ATPase I	ATPase II	I/II	ATPase I	ATPase II	I/II
	µMoles Pi/h. mg		%	µ Moles Pi/h. mg		%
Vessie	1,60	3,37	49,8	2,32	3,02	76,8
Vessie	1,68	3,13	53,7	2,13	2,24	95,1
Peau	2,05	2,88	71,2	2,19	2,38	92,0

DISCUSSION

Il est possible de mettre en évidence dans les cellules épithéliales de la peau et la vessie de grenouille une activité ATPasique, dépendant pour son activation à la fois du sodium et du potassium, inhibée par l'ouabaine,et attachée à une fraction membranaire. Cette activité ATPasique satisfait donc les critères qui, selon SKOU (19), permettent d'assigner à une ATPase un rôle dans un transport actif de sodium.

Cependant, cette activité ATPasique présente une caractéristique tout à fait particulière : l'activation en fonction de la concentration de sodium présente deux optimum, l'un entre 3 et 10 mM de sodium, l'autre entre 30 et 100 mM.

BONTING et al. (52) qui, les premiers, ont cherché à mettre l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante en relation avec le mécanisme de transport actif trans-épithélial dans la peau et la vessie, n'ont mis en évidence qu'un seul optimum d'activation par le sodium, à la concentration de 58 mM ; toutefois, ils ont étudié l'activité ATPasique dans un homogénat de peau ou de vessie, constitué donc en majeure partie d'éléments cellulaires provenant du tissu conjonctif puisque celui-ci représente 80 à 90 % de l'épaisseur totale de la peau ou de la vessie. Comme ROTUNNO et al. (53) ont montré que l'activité ATPasique était répartie dans toute l'épaisseur de la peau, il est tout à fait vraisemblable que le premier optimum d'activation, s'il est particulier aux cellules épithéliales, n'ait pas été décelable dans un homogénat contenant une proportion importante d'autres types cellulaires.

La nécessité de commencer par isoler les cellules épithéliales, la fragilité particulière de l'activité ATPasique Na^+, K^+ - dépendante de vessie, nous ont conduit à employer un mode de préparation de l'extrait enzymatique assez différent de ceux habituellement utilisés pour d'autres tissus ; pour pouvoir comparer nos résultats avec ceux antérieurement publiés, et bien mettre en évidence les particularités

éventuelles de l'activité ATPasique de cellules épithéliales, une étape intermédiaire nous a paru nécessaire, consistant à étudier dans nos conditions expérimentales une ATPase dont les propriétés et la relation avec le transport de sodium soient bien établies.

Comme c'est le cas pour les cellules nerveuses (69), nous avons étudié l'ATPase du cerveau de grenouille et comparé systématiquement au cours des mêmes expériences les propriétés de l'activité ATPasique des cellules épithéliales de vessie à celles de l'activité ATPasique de cerveau préparée de façon identique. Les propriétés de l'ATPase de cerveau que nous avons étudiées : activation par le sodium et le potassium, inhibition par l'ouabaine, sont tout à fait conforme à celles décrites par d'autres auteurs (70) dans le cas du cerveau de mammifère, ou dans le cas d'autres tissus (cf. rev. 19); en particulier, l'activation de l'ATPase par le sodium présente un seul optimum, à 60 mM dans nos conditions également ; ceci indique qu'aucun artéfact de préparation ou de manipulation ne peut rendre compte du comportement de l'activité ATPasique de vessie ou de peau en fonction de la concentration de sodium.

La présence de deux optima en fonction de la concentration de sodium suggère qu'il existe dans les cellules épithéliales de peau ou de vessie deux ATPases distinctes, l'une activée par de faibles concentrations de sodium, à partir de 0,3 mM (ATPase I), l'autre (ATPase II), activée par des concentrations plus fortes, dont l'addition donne la courbe complexe d'activité ATPasique observée en fonction de la concentration de sodium. En effet, il est peu probable qu'une seule espèce enzymatique puisse présenter deux optima en fonction de la concentration d'un agent activateur. De plus, l'action régulatrice de l'aldostérone entraine une modification de l'amplitude relative des deux optima, ce qui n'est explicable que s'il existe deux ATPases contrôlées indépendamment.

A la concentration de 60 mM de Sodium, l'activité ATPasique est de façon prédominante due à l'activité de l'ATPase II ; cette concentration de sodium est également optimale pour l'ATPase de cerveau.

A cette concentration de sodium, la dépendance du pH, les caractéristiques de l'activation par le potassium et de l'inhibition par l'ouabaïne sont identique pour les activités ATPasiques de cerveau et de vessie ce qui suggère une analogie entre l'ATPase II de vessie et l'ATPase de cerveau.

Quand un des deux enzymes constituant l'ATPase, la phosphatase K^+ - dépendante, qui assure la déphosphorylation du dérivé phosphorylé par la kinase est rendu inopérant par l'absence de potassium, il est possible d'étudier l'activation par le sodium de la kinase, en mesurant la quantité de dérivé phosphorylé accumulé en fonction de la concentration de sodium. Les caractéristiques d'activation de la kinase sont identiques dans le cas de la vessie ou de la peau et dans le cas du cerveau, même pour les concentrations de sodium les plus faibles.

Il est donc probable que l'activité kinasique mise en évidence dans l'extrait de cellules épithéliales n'est impliquée que dans l'activité ATPasique II, analogue dans les cellules épithéliales et le cerveau.

L'évolution de la quantité de dérivé phosphorylé formé en fonction de la concentration de sodium est en outre analogue à celle obtenue par POST et al. (71) dans le cas de l'ATPase de rein.

Une autre observation conduit à attribuer le dérivé phosphorylé mis en évidence à l'ATPase II de cellules épithéliales : la courbe de formation en fonction de la concentration de sodium et la concentration maximale du dérivé phosphorylé sont identiques, que l'extrait enzymatique provienne de grenouilles adaptées au Ringer ou de grenouilles ayant été traitées à l'aldostérone. Or, l'action régulatrice de l'aldostérone s'exerce surtout au niveau des concentrations de sodium optimales pour l'ATPase I. Le dérivé phosphorylé correspondant à l'ATPase I, s'il existe, devrait donc avoir une concentration maximale différente selon le traitement de la grenouille ; il est probable qu'il ne se forme pas dans ces conditions expérimentales, et que le dérivé phosphorylé insensible à la régulation par l'aldostérone représente le

dérivé phosphorylé correspondant à l'ATPase II.

Il est possible d'étudier directement les caractéristiques de la partie phosphatasique de l'ATPase en substituant au dérivé phosphorylé qui est son substrat naturel un substrat phosphorylé artificiel. Les propriétés de la phosphatase K^+ - dépendante mise en évidence dans les extraits de cellules épithéliales de vessie sont analogues à celles de la phosphatase correspondante de cerveau ; les résultats sont en accord avec les résultats obtenus sur le cerveau de cobaye (66). Cette phosphatase K^+ - dépendante pourrait correspondre à la partie phosphatasique de l'ATPase II.

Il est donc vraisemblable que l'ATPase II présente dans les extraits de cellules épithéliales est constituée d'une kinase Na^+ - dépendante et d'une phosphatase K^+ - dépendante, et fonctionne de façon identique aux ATPases d'autres tissus. Dans le globule rouge, POST et al. (51) ont montré que l'ATPase est impliquée dans le transport vers l'extérieur de 3 ions sodium en échange de 2 ions potassium transportés vers l'intérieur de la cellule. L'ATPase II présentant les mêmes caractéristiques, il est tentant de lui assigner un rôle dans un mécanisme de transport analogue situé au niveau des membranes séreuses des cellules épithéliales. Les propriétés de l'ATPase II rendent compte des propriétés décrites pour le transfert actif de sodium : celui-ci est inhibé par l'ouabaine et l'absence de potassium dans le milieu séreux (25). Cependant, les concentrations de sodium nécessaires à son activation sont trop élevées pour que cette ATPase puisse correspondre au mécanisme de transport actif situé à la face séreuse, dans l'hypothèse ou l'entrée du sodium à la face muqueuse est passive, puisque d'après les résultats du chapitre III, la concentration intracellulaire devrait être abaissée jusqu'à 0,05 mM de sodium ce qui signifie que l'activité ATPasique devrait être activée à partir de cette concentration.

L'ATPase I a été encore peu étudiée ; en particulier le mécanisme des réactions partielles, impliquant éventuellement une kinase

et une phosphatase comme dans le cas de l'ATPase II, est totalement inconnu. Le fait qu'elle soit activée par le sodium et le potassium, et inhibée par l'ouabaine qui est un inhibiteur spécifique du transport du sodium invite à la mettre en relation également avec un mécanisme de transport actif de sodium. Son activation par de faibles concentrations de sodium la rend apte à jouer un rôle dans un transport de sodium à partir d'un milieu contenant peu de sodium; une localisation éventuelle sur la face séreuse comme l'ATPase II dans l'hypothèse d'une entrée passive du sodium à la face muqueuse, paraît peu logique : dans les conditions naturelles pour la grenouille, aussi bien la peau que la vessie sont en contact par leur face muqueuse avec des milieux dont la concentration en sodium est très faible; seul le mécanisme de transport de sodium dépendant de l'ATPase I pourrait être utilisé pour maintenir la concentration intracellulaire inférieure à celle du milieu; on ne voit donc pas à quoi pourrait servir l'ATPase II. Au contraire, l'hypothèse que l'ATPase I est localisée dans la membrane muqueuse et liée à un transport actif de sodium du milieu externe vers l'intérieur des cellules est beaucoup plus satisfaisante : en effet, l'existence au niveau de la face muqueuse d'un mécanisme capable de transporter du sodium à partir d'un milieu dilué et maintenant la concentration intracellulaire suffisamment élevée pour alimenter un mécansimes de transport actif séreux, dépendant d'une ATPase ordinaire comme l'ATPase II, rend parfaitement compte de la caractéristique de ces cellules qui est de transporter du sodium d'un milieu dilué vers un milieu concentré. En outre, plusieurs auteurs (72, 73) ont localisé l'action de l'aldostérone sur la face muqueuse des cellules épithéliales ; la localisation de l'ATPase I soumise à une régulation par l'aldostérone, sur la face muqueuse est en accord avec leur hypothèse.

La présence d'AMP cyclique dans le milieu augmente l'activité maximale de l'ATPase I ; de plus, l'ATPase I est activée par des concentrations de sodium plus faibles en présence d'AMPcyclique qu'en son absence : l'AMP cyclique produit une diminution du km apparent de l'ATPase I pour le sodium. L'activité ATPasique est augmentée approximativement de la même quantité pour les concentrations de sodium comprises

entre l'optimum de l'ATPase I et celui de l'ATPase II ; cependant, il n'est pas sûr que l'AMP cyclique active également l'ATPase II, en effet, pour ces concentrations, l'activité ATPasique est en fait la somme des activités des ATPases I et II, et une action activatrice de l'AMPcyclique sur l'ATPase I seule pourrait rendre compte de l'augmentation de l'activité ATPasique dans tout ce domaine.

La concentration d'AMPcyclique utilisée (10^{-5}M) est supérieure à la concentration intracellulaire, même quand celle-ci est augmentée sous l'action des hormones neurohypophysaires (10^{-7}M); nous avons choisi cette concentration élevée, et ajouté de la théophylline (10^{-4}M) au milieu d'incubation pour être sûrs que l'action de la phosphodiestérase n'abaisse pas, pendant la durée de l'expérience, la concentration d'AMP cyclique au dessous des valeurs physiologiquement active. Bien que la démonstration d'une activation de l'ATPase I par des concentrations plus faibles soit souhaitable, il est vraisemblable que cette activation représente l'action physiologique de l'AMPcyclique.

Quelques résultats préliminaires ont été publiés (74)

CONCLUSION GENERALE

Dans l'hypothèse où l'ATPase I est liée à un mécanisme de transport actif de sodium sur la face muqueuse, l'action de l'AMP cyclique est d'augmenter la capacité de transport de ce mécanisme aux basses concentrations de sodium, et d'augmenter son activité maximale. Nous avons montré dans le chapitre II que l'AMP cyclique remplit les conditions nécessaires pour être le médiateur intracellulaire des hormones neurohypophysaires. Son action sur l'ATPase I rend compte des effets de l'ocytocine décrits dans le chapitre III : une augmentation du flux entrant de sodium, caractérisée par une augmentation de la capacité du transport aux faibles concentrations de sodium (augmentation du km apparent pour le Sodium) et une augmentation de la capacité maximale de transport (augmentation de Vm) à la concentration de sodium optimale.

Il est donc possible d'interpréter d'une manière nouvelle l'action des hormones neurohypophysaires sur le transport actif de sodium à travers la peau et la vessie de grenouille : l'hormone, par l'intermédiaire d'un "second messager", l'AMPcyclique, provoque l'activation d'un mécanisme de transport actif de sodium particulier à ces cellules épithéliales, localisé dans leur membrane muqueuse. Ce mécanisme de transport actif transfère le sodium du milieu muqueux dans la cellule ; de là, le sodium est transféré dans le milieu séreux par le mécanisme de transport actif localisé dans la membrane séreuse.

RESUME

Dans ce travail, nous avons étudié le mécanisme par lequel l'ocytocine stimule la réabsorption de sodium effectuée par les cellules épithéliales de la peau de la grenouille (effet natriférique).

L'existence d'une étape intermédiaire, suivant l'interaction de l'ocytocine avec son récepteur, a d'abord été étudiée.
Pour l'étude de cette étape, l'action de la noradrénaline a été utilisée comme terme de comparaison, car il a été établi sur d'autres tissus que les actions β des catécholamines s'exercent par l'intermédiaire de l'AMP cyclique, qui joue le rôle de médiateur intracellulaire. Nous avons montré que la noradrénaline, pour des concentrations comprises entre 10^{-8} et 10^{-6} M, stimule le flux entrant de sodium ; cette action natriférique est identique à celle de l'ocytocine. Elle implique l'interaction de la noradrénaline avec des récepteurs de type β. La théophylline, qui inhibe la destruction de l'AMP cyclique, amplifie de la même façon l'effet de la noradrénaline et de l'ocytocine. Ce résultat indique que l'ocytocine, comme la noradrénaline, stimule la production intracellulaire de l'AMP cyclique. D'autre part, l'AMP cyclique reproduit l'effet natriférique de ces deux hormones. L'action natriférique de l'ocytocine implique donc comme celle de la noradrénaline une étape intermédiaire : l'interaction de l'hormone avec son récepteur stimule la production d'un médiateur intracellulaire, l'AMP cyclique, qui est responsable de l'effet natriférique.

Le mécanisme de l'action natriférique a été ensuite étudié. Nous avons montré que, pour des concentrations de sodium dans le milieu muqueux suffisamment basses, le flux net de sodium est inversé (dirigé du milieu séreux vers le milieu muqueux). Dans cette condition, la concentration intracellulaire de sodium doit être supérieure à la concentration de sodium dans le milieu muqueux. Si l'effet natriférique de l'hormone consiste en une augmentation de la perméabilité passive de la face muqueuse pour le sodium, ainsi qu'il est généralement admis, l'ocytocine doit provoquer une augmentation du flux sortant de sodium.

Nous avons observé, au contraire, que l'ocytocine augmente le flux entrant de sodium. Ceci indique que l'effet natriférique de l'hormone est dû à la stimulation d'un mécanisme de transport actif de sodium.

Ce mécanisme de transport actif de sodium a pu être étudié directement par la mesure de l'activité ATPasique Na^+, K^+-dépendante, sur des extraits de cellules épithéliales de peaux et de vessies, après la séparation du tissu conjonctif. Nous avons pu mettre en évidence deux activités ATPasiques Na^+, K^+ - dépendantes. L'une est activée par de faibles concentrations de sodium, ses propriétés correspondent à celles d'un système de transport actif localisé à la face muqueuse; son activité est contrôlée par l'AMP cyclique. L'autre est activée par des concentrations de sodium plus fortes, ses propriétés sont analogues à celles des ATPases associées au transport actif de sodium dans d'autres tissus. Elle peut correspondre au mécanisme de transport actif de sodium, dont la présence sur la face séreuse des cellules a été suggérée.

D'après les résultats précédants, le mécanisme de l'action natriférique de l'ocytocine peut être interprété d'une façon nouvelle: l'hormone, par l'intermédiaire d'un "deuxième messager", l'AMP cyclique, provoque l'activation d'un mécanisme de transport actif de sodium, particulier aux cellules épithéliales de la peau et de la vessie, localisé sur leur face muqueuse. Ce mécanisme de transport actif transfère le sodium du milieu muqueux dans la cellule;de là, il est transféré dans le milieu séreux par le mécanisme de transport actif localisé à la face séreuse.

BIBLIOGRAPHIE

1. S. JARD. Etude des effets de la vasotocine sur l'excrétion de l'eau et des électrolytes par le rein de la grenouille: Rana esculenta : analyse à l'aide d'analogues artificiels de l'hormone naturelle des caractères structuraux requis pour son activité biologique. J. Physiologie (Paris), 58, sup. 15, 1966.

2. F.A. FUHRMAN and H.H. USSING. A characteristic response of the isolated frog skin potential to neurohypophyseal principles and its relation to the transport of sodium and water. J. Cell. Comp. Physiol., 38, 109-130, 1951.

3. F. MOREL, J. MAETZ et C. LUCARAIN. Action de deux peptides neurohypophysaires sur le transport actif de sodium et le flux net d'eau à travers la peau de divers batraciens anoures. Biochim. Biophys. Acta, 28, 619-626, 1958.

4. A. LEAF. Some actions of neurohypophysial hormones on a living membrane. J. Gen. Physiol., 43, 175-189, 1960.

5. A. LEAF and R.M. HAYS. The effects of neurohypophyseal hormone on permeability and transport in a living membrane. In Recent Progress in hormone research, Acad. Press inc. N.Y. 1961, Vol. 17, 467-492.

6. J. BOURGUET et J. MAETZ. Arguments en faveur de l'indépendance des mécanismes d'action de divers peptides neurohypophysaires sur le flux osmotique d'eau et sur le transport actif de sodium au sein d'un même récepteur ; études sur la vessie et la peau de Rana esculenta L. Biochim. Biophys. Acta, 52, 552-565, 1961.

7. H. WIRZ. Der osmotische druck in den corticalen tubuli der rattenniere. Helv. Physiol. Acta, 14, 353-362, 1956.

8. F. MOREL. Action of neurohypophyseal hormones on the active transport of sodium. In DEGRAEFF et LEIJNSE , ed., water and electrolyte metabolism : II, Elsevier,Amsterdam, 91-103, 1964.

9. J. CRABBÉ. Stimulation of active sodium transport across the isolated toad bladder after injection of aldosterone to the animal. Endocrinology, 69, 673-682, 1961.

10. J. MAETZ, J. JARD et F. MOREL. Action de l'aldostérone sur le transport actif de sodium de la peau de grenouille. C.R. Acad. Sci., Paris, 247, 516-518, 1958

11. J. CRABBÉ. Stimulation of active sodium transport by the isolated toad bladder with aldosterone in vitro. J. Clin. Invest., 40, 2103-2110, 1961.

12. G.W.G. SHARP and A. LEAF. Biological action of aldosterone in vitro. Nature, Lond., 202, 1185-1188, 1964.

13. G.A. PORTER and I.S. EDELMAN. The action of aldosterone and related corticosteroids on sodium transport across the toad bladder. J. Clin. Invest., 43, 611-620, 1964.

14. H. H. USSING and K. ZERAHN. Active transport of sodium as the source of eletric current in the short-circuited isolated frog skin. Acta Physiol. Scand., 23, 110-127, 1951.

15. K. ZERAHN. Nature and localization of the sodium pool during active transport in the isolated frog skin. Acta Physiol. scand., 77, 272-281, 1969.

16. H.S. FRAZIER, E.F. DEMPSEY and A. LEAF. Movement of sodium across the mucosal surface of the isolated toad bladder and its modification by vasopressin. J. Gen. Physiol., 45, 529-543, 1962.

17. J. ORLOFF and J.S. HANDLER. Vasopressin - like effects of adenosine 3', 5' -phosphate (cyclic 3' 5' -AMP) and theophylline in the toad bladder. Biochem. Biophys. Res. Commun., 5, 63-66, 1961.

18. J. ORLOFF and J.S. HANDLER. The similarity of effects of vasopressin, adenosine-3', 5' -phosphate (cyclic AMP) and theophylline on the toad bladder. J. Clin. Invest., 41, 702-709, 1962.

19. J.C. SKOU. Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev., 45, 596-617, 1965.

20. E. DU BOIS REYMOND. Untersuchungen über tierische elektrizität. Berlin, 1848.

21. E. HUF. Versuche über den Zusammen⁄hang zwischen Stoffwechsel, Potentialbildung und funktion des Froschhaut. Arch. ges. Physiol., 235, 655, 1935.

22. A. KROGH. Osmotic regulation in the frog (R. esculenta) by active absorption of chloride ions. Scand. Arch. Physiol., 76, 60-74, 1937.

23. H.H. USSING. The active ion transport through the isolated frog skin in the light of tracer studies. Acta Physiol. Scand., 17, 1-37, 1949.

24. H.H. USSING. The distinction by means of tracers between active transport and diffusion. Acta Physiol. Scand., 19, 43-56, 1949.

25. V. KOEFOED-JOHNSEN and H.H. USSING. The nature of the frog skin potential. Acta Physiol. Scand., 42, 298-308, 1958.

26. H.H. USSING. The frog skin potential. J. Gen. Physiol., 43, sup. 5, 135-147, 1960.

27. J. ORLOFF and J.S. HANDLER. The role of adenosine 3' 5'-phosphate in the action of antidiuretic hormone. Am. J. Med., 42, 757-768, 1967.

28. T. W. RALL and E.W. SUTHERLAND. Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles. J. Biol. Chem., 232, 1065-1076, 1958.

29. E.G. KREBS, R.S. DELANGE, R.G. KEMP and W.D. RILEY. Activation of skeletal muscle phosphorylase. Pharmacol. Rev., 18, 163-171, 1966.

30. G.A. ROBISON, R.W. BUTCHER and E.W. SUTHERLAND. Cyclic AMP. Biochem. Rev., 149-174, 1968.

31. V. KOEFOED-JOHNSEN, H.H. USSING and K. ZERAHN. The origin of the short circuit current in the adrenalin stimulated frog skin. Acta physiol. scand., 27, 38-48, 1952.

32. F. MOREL, M. ODIER et C. LUCARAIN. Un dispositif de mesures multiples et simultanées du transport actif de sodium à travers plusieurs régions d'une même peau de grenouille. J. Physiol. Paris, 53, 757-762, 1961.

33. C.E. POWELL and I.H. SLATER. Blocking of inhibitory adrenergic receptors by a dichloroanalog of isoproterenol. J. Pharmacol., 122, 480- , 1958.

34. A.V. HILL. J. Physiol., 40, 4p, 1910.

35. B.J. BENSON and M.E. HADLEY. In vitro characterisation of adrenergic receptors controlling skin gland secretion in two anurans Rana pipiens and Xenopus laevis Comp. Biochem. Physiol., 30, 857-864, 1969.

36. C.S. GONZALEZ, J. SANCHEZ-O. and J. CONCHA-B. Changes in potential difference and short-circuit current produced by electrical stimulation in a nerve skin preparation of the toad. Biochim. Biophys. Acta, 120, 186-194, 1966.

37. F. BASTIDE et S. JARD. Actions de la noradrénaline et de l'ocytocine sur le transport actif de sodium et la perméabilité à l'eau de la peau de grenouille. Rôle du 3', 5'-AMP cyclique. Biochim. Biophys. Acta, 150, 113-123, 1968.

38. J.S. HANDLER, R. BENSINGER and J. ORLOFF. Effects of adrenergic agents on toad bladder response to ADH, 3' 5'-AMP and theophylline. Am. J. Physiol., 215, 1024-1031, 1968.

39. J.S. HANDLER, R.W. BUTCHER, E.W. SUTHERLAND and J. ORLOFF. The effect of vasopressin and of theophylline on the concentration of adenosine 3' 5' -phosphate in the urinary bladder of the toad. J. Biol. Chem., 240, 4524-4526, 1965.

40. P.F. GULYASSY and I.S. EDELMAN. Effect of pH and theophylline on uptake, elution, and antidiuretic action of cyclic AMP. Am. J. Physiol., 217, 740-746, 1967.

41. J. BOURGUET. Cinétique de la perméabilisation de la vessie de grenouille par l'ocytocine. Rôle du 3'-5' adénosine monophosphate cyclique. Biochim. Biophys. Acta, 150, 104-112, 1968.

42. S. JARD, F. BASTIDE et F. MOREL. Analyse de la relation'dose-effet biologique' pour l'action de l'ocytocine et de la noradrénaline sur la peau et la vessie de la grenouille. Biochim. Biophys. Acta, 150, 124-130, 1968.

43. J. BOURGUET et F. MOREL. Indépendance des variations de perméabilité à l'eau et au sodium produites par les hormones neurohypophysaires sur la vessie de grenouille Bioch. Biophys. Acta, 135, 693-700, 1967.

44. M. CEREIJIDO and P.F. CURRAN. Intracellular eletrical potential in frog skin. J. Gen. Physiol., 48, 543-557, 1965.

45. M. CEREIJIDO and C.A. ROTUNNO. Transport and distribution of sodium across frog skin. J. Physiol., Lond., 190, 481-497, 1967.

46. L.B. KIRSCHNER. On the mechanism of active sodium transport across the frog skin. J. cell. Comp. Physiol., 45, 61-87, 1955.

47. M.M. CIVAN, O. KEDEM and A. LEAF. Effect of vasopressin on toad bladder under conditions of zero net sodium transport. Am. J. Physiol., 211, 569-575, 1966.

48. H.H. USSING and E.E. WINDHAGER. Nature of Shunt path and active sodium transport path through frog skin epithelium. Acta Physiol. Scand., 61, 484-504, 1964.

49. F. MOREL et F. BASTIDE. Action de l'ocytocine sur la composante active du transport de sodium par la peau de grenouille. Biochim. Biophys. Acta, 94, 609-611, 1965.

50. F. MOREL and F. BASTIDE. Relationships between the natriferic action of oxytocinand the active transport of sodium through the frog's skin. Protoplasma, 43, 56-61, 1967.

51. A.K. SEN and R.L. POST. Stoichiometry and localization of adenosine triphosphate -dependant sodium and potassium transport in the erythrocyte. J. Biol. Chem., 239, 345-352, 1964.

52. S.L. BONTING and L.L. CARAVAGGIO. Studies on sodium potassium-activated adenosine triphosphatase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues. Arch. Biochem. Biophys. 101, 37-46, 1963.

53. C.A. ROTUNNO, M.I. POUCHAN and M. CEREIJIDO. Location of the mechanism of active transport of sodium across the frog skin. Nature, 210, 597-599, 1966.

54. K. ZERAHN. Oxygen consumption and active sodium transport in the isolated and short-circuited frog skin. Acta Physiol. Scand. 36, 300-318, 1956.

55. R. M. HAYS, M.D.B. SINGER and S. MALAMED. The effect of calcium withdrawal on structure and function of the toad bladder. J. Cell. Biol., 25, 195-208, 1965.

56. J.T. GATZY and W.O. BERNDT. Isolated epithelial cells of the toad bladder. Their preparation, oxygen consumption and electrolyte content. J. Gen. Physiol., 51, 770-784, 1968

57. J. KAWADA, R.E. TAYLOR and S.B. BARKER. Mesurement of Na-K-ATPase in the separated epidermis of Rana catesbeiana frogs and tadpoles. Comp. Biochem. Physiol., 30, 965-975, 1969.

58. R.L. POST, C.R. MERRIT, C.R. KINSOLVING and C.D. ALBRIGHT. Membrane adenosine triphosphataseas a participant in the active transport of sodium and potassium in the human erythrocyte. J. Biol. Chem., 235, 1796-1802, 1960.

59. S. FAHN, G.J. KOVAL and R.W.ALBERS. Sodium-potassium activated adenosine triphosphatase of Electrophorus eletric organ. I an associated sodium-activated transphosphorylation. J. Biol. Chem., 241, 1882-1889, 1966.

60. J. CRABBÉ. Stimulation by aldosterone of active sodium transport across the isolated ventral skin of amphibia. Endocrinology, 75, 809-811, 1964.

61. C.H. FISKE and Y. SUBBAROW. J. Biol. Chem. 66, 375, 1925.

62. R.L. POST and A.K. SEN. Sodium and potassium stimulated ATPase. in Methods in Enzymology (COLOWICK and KAPLAN) ESTABROOK and PULLMANN Ed. Vol. X, 762-768, 1967.

63. O.H. LOWRY, N.J. ROSENBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL. Protein mesurment with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.

64. C.R. KINSOLVING, R.L. POST and D.L. BEAVER. Sodium plus potassium transport adenosine triphosphatase activity in kidney J. Cell. Comp. Physiol., 62 , 85-93, 1963.

65. T. NAKAO, Y. TASHIMA, K. NAGANO and M. NAKAO. Highly specific-sodium potassium-activated adenosine triphosphatase from various tissues of rabbit. Biochem. Biophys. res. com., 19, 755-758, 1965.

66. H. YOSHIDA, K. NAGAI, T. OHASHI and Y. NAKAGAWA. K^+-dependant phosphatase activity observed in the presence of both adenosine triphosphate and Na^+. Biochim. Biophys. Acta, 171, 178-185, 1969.

67. R.L. POST, S. KUME, T. TOBIN, B. ORCUTT, and A.K SEN. Flexibility of an active center in sodium plus potassium adenosine triphosphatase. J. Gen. Physiol., 54, 306_S-326_S, 1969.

68. H.G. FERREIRA and M.W. SMITH. Effect of a saline environment on sodium transport by the toad colon. J. Physiol., Lond., 198, 329-343, 1968.

69. J.C. SKOU. Preparation from mammalian brain and kidney of the enzyme system involved in active transport of Na^+ and K^+. Biochim. Biophys. Acta, 58, 314, 1962.

70. L.S. BASKIN and R.B. LESLIE. Effects of substrates and products on beef brain microsomal (Na^++K^+ +Mg^{++}) ATPase activity. Biochim. Biophys. Acta, 159, 509-513, 1968.

71. R.L. POST, A.K. SEN and A.S. ROSENTHAL. A phosphorylated intermediate in adenosine triphosphate - dependant sodium and potassium transport across kidney membranes. J. Biol. Chem., 240, 1437-1445, 1965.

72. G.W.G. SHARP, H. COGGINS, N.S. LICHTENSTEIN and A. LEAF. Evidence for a mucosal effect of aldosterone on sodium transport in the toad bladder. J. Clin. Invest. 45, 1640-1646, 1966.

73. J. CRABBÉ and E. EHRLICH. Amiloride and the mode of action of aldosterone on sodium transport across toad bladder and skin. Pflügers Arch., 304, 284-296, 1968.

74. G. CACHELIN et F. BASTIDE. Mise en évidence de deux ATPases activées par le sodium et le potassium dans les cellules épithéliales de la vessie de grenouille. C.R. Acad. Sci., Paris, 267, 906-907, 1968.